جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم الكيمياء التحليلية والغذائية

مساهمة تحليلية في دراسة بعض الطرائق التحليلية [مقياس الطيف الضوئي – SPECTROPHOTOMETRY مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY] لمقايسة السيلينيوم في بعض المتممات الغذائية في السوق المحلية

Analytical contribution to study some of analytical methods [Spectrophotometry - Atomic Absorption Spectrometry] for selenium determination in some food supplements in local market

بحث علمي أعد لنيل درجة الماجستير في الكيمياء التحليلية و الغذائية

إعداد الصيدلانية

لينة محمدعلي كتمتو

بإشراف

الأستاذ الدكتور جمعة الزهوري

2012 - 1433

تصريح

أصرح بأن البحث الموصوف في هذه الأطروحة تحت عنوان :

" مساهمة تحليلية في دراسة بعض الطرائق التحليلية [مقياس الطيف الضوئي – Spectrophotometry مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري Atomic] Absorption Spectrometry لمقايسة السيلينيوم في بعض المتممات الغذائية في السوق المحلية "

لم يسبق أن قدم للحصول على أية درجة جامعية أخرى وغير مقدم حالياً لذلك ، وأن كافة الأعمال والنتائج المذكورة هي ناتج جهودي الشخصية وبتوجيه من المشرف العلمي وأن أية معلومات أو نتائج أخرى أخرى ذكرت في الأطروحة نسبت مصادرها ومؤلفيها في النص وفي قائمة المراجع .

المرشح

لينة محمد علي كتمتو

Declaration

I declare that the present research entitled :

" Analytical contribution to study some of analytical methods [Spectrophotometry - Atomic Absorption Spectrometry] for selenium determination in some food supplements in local market "

Is a new research that has never been studied by any other researcher for any other degree , and currently is not submitted by any one for any degree .

Candidate

Lina Mhd Ali Katamto

الشكر

أبدأ بشكر الله عز وجل الذي وفقني بفضله لإنجاز هذا البحث .

أتقدم بفائق الاحترام والتقدير والامتنان وجزيل الشكر للأستاذ الدكتور جمعة الزهوري لتفضله بالإشراف على هذه الرسالة ولما قدمه لي من دعم وتوجيهات ونصائح قيمة ، فلم يدخر وقتاً والا جهداً في سبيل إنجاز هذا العمل ، وإن الكلمات لتقف عاجزة عن إيفائه حقه من الشكر والثناء ، جزاه الله كل خير .

الشكر جزيل إلى الأساتذة الكرام الأستاذة الدكتورة جليانا تراكي ، والأستاذ الدكتور عامر السقا أميني لتفضلهم بالمشاركة في لجنة الحكم

وتقويم هذا البحث ، وشكراً على ملاحظاتهم القيمة التي أغنت البحث .

حينما نعبر شط العمل الدؤوب لايبقى في داخلنا سوى أولئك الذين غرسوا زهراً جميلاً في طريقنا ، أولئك الذين منحونا العزم تلو العزم لنتخطى الصعاب ونقف واثقي الخطى نشاطرهم الإبداع حرفاً وألقاً. لا يسع حروفي أن تعبر عن شكري وخالص امتناني لأسرة كلية الصيدلة بكادريها التعليمي والإداري ممثلة بعميدها الأستاذ الدكتور جمعة الزهوري ونائبيه للشؤون العلمية والإدارية الأستاذة الدكتورة سحر الفاهوم والأستاذ الدكتور سامر حيدر.

كما أخص بالشكر رئاسة قسم الكيمياء التحليلية والغذائية ممثلة بالأستاذة الدكتورة جليانا تراك وجميع الأعضاء من هيئة تدريسية وموظفين ومخبريين .

كما أتقدم بفائق الشكر والامتنان إلى مختبر الرقابة الغذائية في وزارة الصحة للتسهيلات الكبيرة المقدمة لإنجاح وإتمام هذا العمل وأخص بالذكر (د.سها ... والكيميائية كندا ... والكيميائية ... والكيميائية....) فلهم مني كل الشكر والتقدير.

كما أتوجه بالشكر لأسرة مختبر الرقابة الدوائية في وزارة الصحة ممثلة بالدكتور حبيب عبود لدعمهم التقني .

لمحة موجزة عن حياة الباحث

الاسم : لينة محمد علي كتمتو

مكان وتاريخ الولادة : العين 26 / 9 / 1985

الجنسية : فلسطينية

الحالة الإجتماعية : عزباء

المؤهل العلمي : بكالوريوس في الصيدلة والكيمياء الصيدلية

المراحل الدراسية :

- درست المرحلة الابتدائية في مدرسة العين العلمية في الإمارات (1991-1997)
- درست المرحلة الإعدادية في مدرسة أم أيمن في الإمارات (1997-2000)
- درست المرحلة الثانوية في مدرسة المناصير في الإمارات (2000-2003)
- درست المرحلة الجامعية في كلية الصيدلة - جامعة دمشق (2003-2008)

الدورات : دورة ICDL - دورة إسعافات أولية من الهلال الأحمر - دورات لغة إنجليزية وألمانية

الفهرس

رقم الصفحة

الدراسة العملية

فهرس الجداول

فهرس الأشكال

المختصرات

RDIs	Recommended Daily Intakes
FAO	Food and Agriculture Organization
WHO	World Health Organization
ULs	The Tolerable Upper Intake Levels
GPx	Glutathione peroxydase
Se-Met	Selenomethionine
Se-Cys	Selenocysteine
ROS	Reactive Oxygen Species
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
RNS	Reactive Nitrogen Species
HIV	Human Immunodeficiency Virus
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
RDA	Recomeneded Dietary Allowance
NAS	National Academy of Sciences
TPN	Total Parenteral Nutrition
FNB	The Food and Nutrition Board

SCF	The European Scientific Committee on Food
AAS	Atomic Absorption Spectrophotometry
GFAAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer
ICP-MS	Inductively coupled plasma - Mass spectrometry
HPLC	High-performance liquid chromatography
3,3 DABH	3,3Diaminobenzidine Hydrochloride
DAN	2,3-Diaminonaphtalen
RSD	Relative Standard Deviation
S.D	Standard deviation
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
ppm	part per million
RB	Relative Bias
ss	Sum Square
df	Degree of Freedom
MS	Mean Square

الدراسة النظرية

Theoretical study

1

Introduction: المقدمة

المتممات الغذائية وتسمى أيضا بالمكملات الغذائية وهي عبارة عن مستحضرات تستخدم لاتمام النظام الغذائي وتوفير بعض الموارد المغذية مثل الفيتامينات ، المعادن ، الألياف ، الحموض الدسمة والحموض الأمينية ، والتي من الممكن أن تكون مفتقدة أو غير مستهلكة بالكميات الكافية في نظام الفرد الغذائي .

بعض البلدان تُعرّف المتممات الغذائية كغذاء ، والبعض الآخر يعرفها كدواء أو منتجات صحية طبيعية . تبعا لـهيئة دستور الأغذيـة Codex Alimentarius Commission و منظمة الصحة العالمية (WHO) ومنظمة الأغذية والزراعة (FAO) تندرج المتمات الغذائية الحاوية على الفيتامينات والمعادن ضمن تصنيف الغذاء [1].

لقد انتشر في الآونة الأخيرة استعمال المتممات الغذائية الحاوية على العديد من المعادن والفيتامينات بشكل مضغوطات وذلك من أجل الوصول للتركيز اليومي المنصوح به (RDIs) من تلك المعادن والفيتامينات .

إن الرقابة الغذائية (رقابة الجودة Quality control) على المعادن في هذه المتممات الغذائية يعتبر أمرهام وذلك لضمان احترام التطابق بين الكمية الموجودة على ملصق عبوة المتمم الغذائي مع المستويات العليا المحتملة عند الإنسان (ULs) .

وبالتالي فإنه لابد من مراقبة مكونات هذه المتممات من فيتامينات ومعادن للتأكد من التراكيز المضافة وبالتالي من الجرعة المأخوذة من قبل المريض .

يحتاج جسم الإنسان لبعض المعادن الهامة (كالسيلينيوم) بكميات زهيدة ، وعند حصول أي نقص أو زيادة عن الحد المطلوب لتلبية حاجة الإنسان فإن ذلك يؤثر على حياة الإنسان.

يعد السيلينيوم من العناصر الهامة لجسم الإنسان والحيوان على حد سواء وقد أصبح له استعمالات دوائية لمعالجة عدد كبير من الأمراض ولدوره البارز في زيادة المناعة للجسم ، ونظرا لأهميته الكبيرة للإنسان والحيوان بالرغم من حدود سميته الضيقة ، فقد حاول الباحثون والمهتمون بسلامة البيئة مراقبة هذا العنصر الهام والسام بآن واحد .

يتوزع السيلينيوم في الطبيعة بنسب مختلفة في الهواء والمياه والغذاء ويحتوي الغذاء على عنصر السيلينيوم بكميات ضئيلة جداً ، فهو ضروري لكثير من العمليات الاستقلابية وللوقاية من أمراض القلب وتصلب الشرايين وأمراض السرطان الخبيث وللوقاية من مرض العضلات البيضاء الذي يصيب الماشية والدواجن وغيرها . كما يدخل في تركيب أنزيم الغلوتاتيون بيروكسيداز (GPx) الذي يحمي الجسم من تراكم فوق الأكاسيد العضوية في الخلية والتي تعد من أكثر مسببات الأمراض السرطانية . إن السيلينيوم عنصر غذائي هام وضروري للحياة وأن نقص هذا العنصر يؤدي إلى اختلال وظائف الجسم الحيوية ، ولذا فمن الضروري إيجاد طرائق تحليلية حساسة ودقيقة لتحديده في المتممات الغذائية.

تهدف هذه الدراسة إلى أمرين أساسيّن :

1- دراسة مقارنة لطرائق استخلاص السيلينيوم من المتممات الغذائية ، ومقارنة الطرائق التحليلية المتبعة في تحليل السيلينيوم ثم اختيار الطريقة الأمثل لاعتمادها في مقايسة السيلينيوم في عينات المتممات الغذائية .

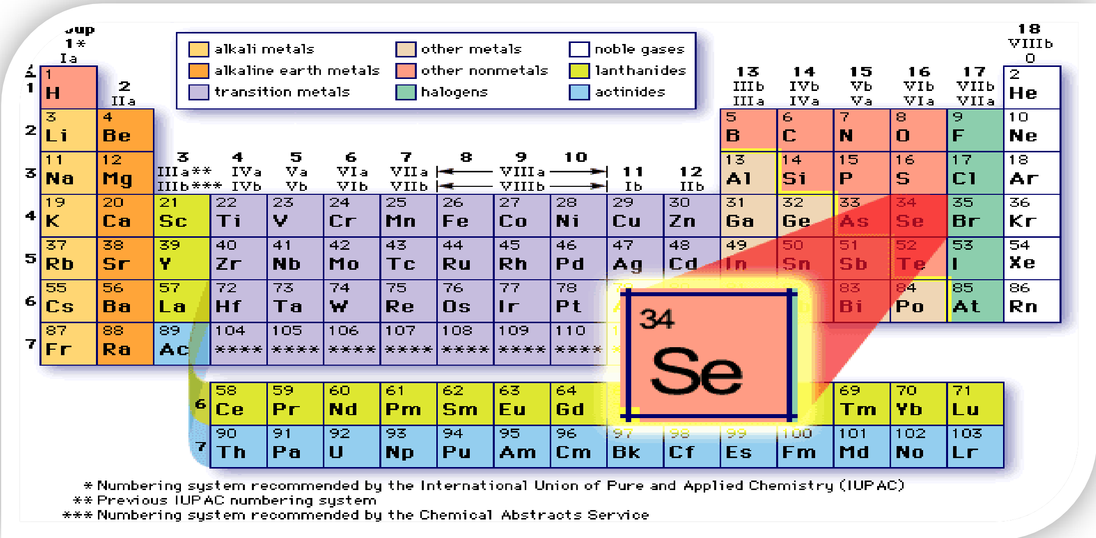
2- تحديد كميات السيلينيوم المضافة إلى عينات المتممات الغذائية الموجودة في السوق المحلية .

2 اكتشاف السيلينيوم وتواجده

Selenium Discovery and Occurrence

اكتشف عنصر السيلينوم من قبل العالم السويدي جون برزيليوس J.J. BERZELIUS. عام 1817 لدى دراسته لمخلفات غرف الرصاص المستخدمة في صناعة حمض الكبريت ، حيث لاحظ وجود عنصراً جديداً يقترب بمواصفاته الكيميائية من عنصر التللوريوم ، لذلك اعتبر أن السيلينيوم والتللوريوم معادناً صلبة متشابهة بخواصها الكيميائية . غير أن الدراسات البحثية الدقيقة اللاحقة أثبتت أن طبيعة العنصرين لا معدنية ، ولم ي تم إنتاج العنصرين بشكل صناعي إلا في عام 1910 .[2-3]

يرمز للسيلينيوم بـــ Se ، موقعه في الجدول الدوري في المجموعة VIA ، في العمود السادس (بين التيليريوم Te والكبريت S) والصف الرابع (بين البروم Br والزرنيخ As) كما هو موضح بالشكل (1) ، رقمه الذري 34 وكتلته الذرية 78.3396 . نادراً ما يوجد بشكله الحر في الطبيعة ، ومن خواصه الفيزيائية أنه عنصر صلب ، درجة انصهاره 221 °C ، ودرجة غليانه 685°C ، وكثافته 4.28 g/cm^3 ، وينحل في الماء بشكل طفيف . بنية بلوراته سداسية الزوايا والأضلاع ، أرقام أكسدته في وسط شديد الحموضة كما يلي : -2 ، +1 ، +2 ، +4 ، +6 [5-4].



الشكل (1) موقع السيلينيوم في الجدول الدوري

السيلينيوم معدن نادر ، بخاره يمتلك رائحة واضحة ومؤذية ، وهو عنصر ليس له كل صفات المعدن فهو شبه معدن ، إلا أنه اصطلح على أن يطلق عليه اسم معدن لأهميته الحيوية وآثاره على الجسم ، وهو يشبه الكبريت بخواصه الكيميائية[7-6]. يوجد له حمضان هما حمض السيلينيوم H_2SeO_4 وحمض السيليني H_2SeO_3 . ويكون حمض السيلينوم مشابها لحمض الكبريت في الأوساط المائية ، حيث يمتاز بتشرد وظيفتيه الحمضيتين وتشكيل شاردة السيلينات SeO_4^{-2}. أما حمض السيليني فهو حمض ضعيف يتشرد على مرحلتين وتأخذ ثوابت تشرده القيم التالية : $pk_2= 8.32$ و $pK_1= 2.62$ [9-8].

يوجد السيلينيوم في الطبيعة متحدا مع بعض العناصر مثل الألمنيوم والرصاص والنحاس والزئبق والفضة على شكل سيلينيد هذه المعادن ، ويستحصل عليه بشكل رئيسي كمنتج ثانوي في صناعة حمض الكبريت [10].

يوجد في التربة والهواء وفي مياه المحيطات والبحار والأنهار ، وتختلف نسبة وجوده من مكان لآخر . تتراوح كميته في مياه الشرب ضمن المجال µg/L(10- 0.2) ، وتصل في مياه بعض المناطق حتى 50 µg/L ، وتحتوي مياه البحار عادة على 0.09 µg/L . كما تختلف كمية هذا العنصر في الغلاف الجوي حسب نوع الصناعات في تلك المنطقة ، ففي المدن تتراوح مابين $(1\text{-}10) ng/m^3$ ، بينما تكون هذه الكمية أقل في المناطق الريفية . وإن الكمية القصوى المسموح بها في الهواء هي $0.2\ mg/m^3$ [12-11].

وتختلف كمية السيلينيوم في الأراضي الزراعية اختلافاً كبيراً، حيث تتراوح مابين (0.1-1200)mg/Kg ، وتكون قليلة في الأراضي الحامضية ومرتفعة في الأراضي القلوية والمعتدلة [14-13].

3 استخدامات السيلينيوم Selenium Uses

يستخدم السيلينيوم في كثير من الصناعات : [15].

- صناعة الزجاج .
- الدهانات والأصبغة .
- منتجات المطاط .
- الصناعات الكهربائية والترانزستورات .
- كاميرات التلفزيون وفي صناعة الخلايا الشمسية .
- كما أنه يوجد في بعض مستحضرات التجميل .
- وفي أوراق السجائر .

4 مصادر السيلينيوم الغذائية
Food Sources of Selenium

1.4 السيلينيوم في الأغذية :

يتوزع السيلينيوم بشكل كبير في الأغذية . يعتبر الغذاء هو المصدر الطبيعي لحصول الإنسان على احتياجاته من معدن السيلينيوم ، وتختلف كمية هذا المعدن في الأغذية المتنوعة ، كما تختلف أيضاً في غذاء معين ، باختلاف موطن هذا الغذاء [16].

يعد الكبد والكلى من أغنى الأطعمة بالسيلينوم ، يليه الأسماك ، البندق والجوز ، اللحوم (لحم البقر – لحم الغنم) ولحم الدجاج ، كما تحتوي بعض الفطور المأكولة وخميرة البيرة كميات جيدة من السيلينيوم . بالإضافة إلى البيض ، منتجات الألبان والحليب . يتواجد السيلينيوم أيضاً بكميات جيدة في الحبوب المختلفة (فاصوليا – عدس – ذرة - قمح – شعير) ، أما في الخضار والفواكه فهي فقيرة غالبا بالسيلينيوم [17].
يبين الشكل (2) والجدول (1) أهم المصادر الغذائية للسيلينيوم .



الشكل (2) أهم المصادر الغذائية للسيلينيوم

الجدول (1) أهم المصادر الغذائية للسيلينيوم [18]

المادة الغذائية (كغ)	متوسط تركيز السيلينيوم (مكغ)
اللحم الأحمر (البقر – الغنم)	130
لحم الدجاج	185
الكبد – الكلى (البقر- الدجاج)	492
الأسماك	360
الزيوت والدهون	30
حليب	14
منتجات الألبان dairy product	32
بيض	194
البندق – جوز	251
الحبوب المختلفة Miscellaneous cereals	39
خبز	44
خضار الخضراء	8
البطاطا	3
الخضار الأخرى	22
الفواكه الطازجة	1
منتجات الفواكه	0.7

2.4 العوامل المؤثرة على محتوى الأغذية من السيلينيوم :

تعتبر الأغذية من المصادر الأساسية للسيلينيوم .يختلف محتوى الأغذية من السيلينيوم نتيجة عدة عوامل منها :

- مستويات السيلنيوم بالتربة حيث يؤثر ذلك على محتوى السيلينيوم بالنباتات التى تنمو بها .

  كما أن الشكل الكيميائي الذي يتواجد عليه السيلينيوم في التربة يؤثر على مستوياته بالنباتات ، حيث يكون السيلينيوم بشكله السداسي التكافؤ Se^{6+} أعلى امتصاص من الشكل الرباعي التكافؤ Se^{4+} [20-19].

  في الولايات المتحدة الأمريكية ، حيث تكون التربة غنية بالسيلينيوم ، يكون متوسط المدخول الغذائي للفرد من السيلينيوم 62 - 216 مكغ/باليوم [21] ، بينما في الصين يكون المدخول الغذائي للفرد من السيلينيوم 3 – 22 مكغ/باليوم . أما في بريطانيا ومعظم الدول الأوروبية فإن متوسط المدخول الغذائي للفرد من السيلينوم 40 مكغ/باليوم [17] .

- محتوى الأغذية من البروتينات ، لأن الكبريت المرتبط بالأحماض الأمينية ممكن أن يستبدل بالسيلينيوم كما في السيلينيوميثيونين (Se-Met) ، والسيلينوسيستين (Se-Cys) أو سيلينوسيستثيونين selenocystathionine وذلك يعود للتشابه الفيزيوكيميائي بين الكبريت والسيلينيوم [19-2] .

- إضافة السيلينيوم للأسمدة بهدف زيادة مستوياته في النباتات المزروعة [22].

- تلوث البيئة المائية الناتج عن النشاطات الصناعية المختلفة ، يؤدي إلى تراكم وزيادة مستويات السيلينيوم في الأسماك والأحياء البحرية [23-19] .

- معالجة الأغذية أو المنتجات الوسيطة intermediary products (الغلي ، الخبيز ، الشوي) ممكن أن يؤدي إلى انخفاض محتوى السيلينيوم بهذه الأغذية [24].
- مستوي السيلينوم في الفواكه أقل من مستواياه في الخضروات ، وذلك لأن الفواكه تحوي على نسبة عالية من الماء ونسبة منخفضة من البروتينات . كما أن معظم الخضروات الطازجة تحوي مستويات منخفضة من السيلينيوم [25-26-27] .

5

توزع السيلينيوم في الجسم
Selenium Distribution in the Body

- **توزع السيلينيوم في الجسم** [28-29] :

يوجد السيلينيوم في جميع خلايا وأنسجة الجسم . يتوزع السيلينيوم في أنسجة الجسم بتراكيز مختلفة حيث يتناقص تركيزه في الأنسجة على الترتيب الكلى > الكبد > الطحال > البنكرياس > القلب > الدماغ > الرئة > العظام > العضلات الهيكلية .

تتركز النسبة العظمى من السيلينيوم في العضلات الهيكلية (27.5 %) ، وبنسبة أقل في العظام (16%) والدم (10%) . يوضح الجدول (2) مستويات السيلينيوم في مكونات الجسم .

ينخفض مستوى السيلينيوم في الحمل والتهاب الكبد وتشمع الكبد وسوء التغذية بالبروتينات. كما أظهرت دراسات عديدة أن تركيز السيلينيوم في الأنسجة المصابة بالسرطان أقل بكثير من الأنسجة بالحالة السليمة ، كما أن تركيز السيلينيوم يكون في أدنى مستوى في الكبد لدى الكحوليين .

عندما يكون التركيز في البول أعلى من 400 µg/L يعتبرتركيزاً سمياً. يبدأ العوز الشديد في المستوى المصلي عند التركيز 17 µg/L ويجب أن يكون المستوى الأعظمي في البول 100 µg/L .

الجدول (2) مستويات السيلينيوم في مكونات الجسم [28]

Selenium levels in the body composition مستويات السيلينيوم في مكونات الجسم	
مكونات الجسم	**التركيز**
البلازما	58 - 234 µg/L
المصل	46 – 143 µg/L
الكريات الحمر	75 – 24 µg/L
الصفيحات الدموية	782 ± 127 ng/g (وزن رطب)
الشعر	0.2 – 114 µg/g (وزن جاف)
البول	7 – 160 µg/L

6

حركية السيلينيوم في العضوية الحية
Pharmacokinetic of Selenium in the Body

1.6 الامتصاص Absorption :

يعد المعي والإثنا عشرية الموقع الرئيسي لامتصاص السيلينيوم في الجسم . يُحمل السيلينيوم الممتص في البلازما ومنها يدخل إلى جميع الأنسجة بما في ذلك العظام والشعر وكريات الدم البيضاء [30]. يتم امتصاص مايقارب 60% أو أكثر من مجمل الوارد الغذائي من السيلينيوم (سواء كان بالشكل العضوي أو بالشكل اللاعضوي) ، وفي بعض الحالات ممكن أن تصل النسبة إلى 100% [31] .

<u>يتأثر امتصاص السيلينيوم بعدة عوامل</u> و التي من شأنها تعزيز أو تثبيط هذا الامتصاص ، وهي [17-32] :

ما **<u>يعزّز</u>** امتصاص السيلينيوم :

* البروتينات .
* Vit.A .
* Vit.E .

ما **<u>يثبّط</u>** امتصاص السيلينيوم :

* الزرنيخ .
* الزئبق .
* الكبريت .

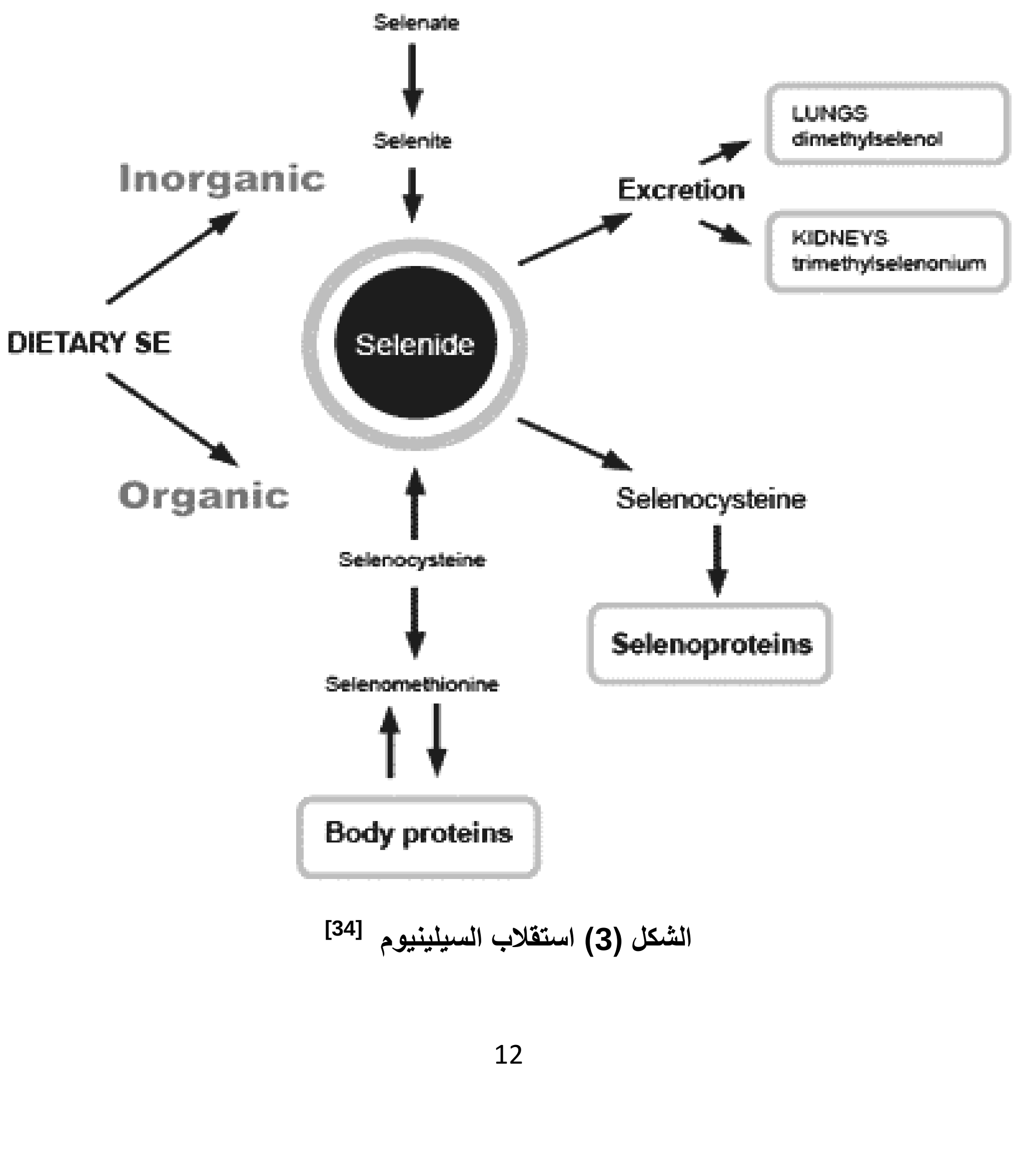
يكون امتصاص السيلينيوم بشكله العضوي (السيلينوميتيونين selenomethionine ، السيلينوسيستين selenocysteine) أكبر من امتصاصه بالشكل اللاعضوي (السيلينات selenate ، السيلينيت selenite) [33] .

2.6 الاستقلاب Metabolism :

يستقلب السيلينيوم الممتص (بشكل يه العضوي واللاعضوي) في الكبد إلى سيلينيد . selenide

كما هو موضح بالشكل (3) ، يتم إرجاع السلينيوم اللاعضوي (سيلينات selenate) لسيلينيت selenite والذي بدوره يستقلب لسيلينيد selenide . أما السيلينيوم العضوي (السيلينوميتونين Selenomethionine) يتحول إلى السيلينوسيستين selenocysteine والذي يستقلب لسيلينيد selenide [34] .

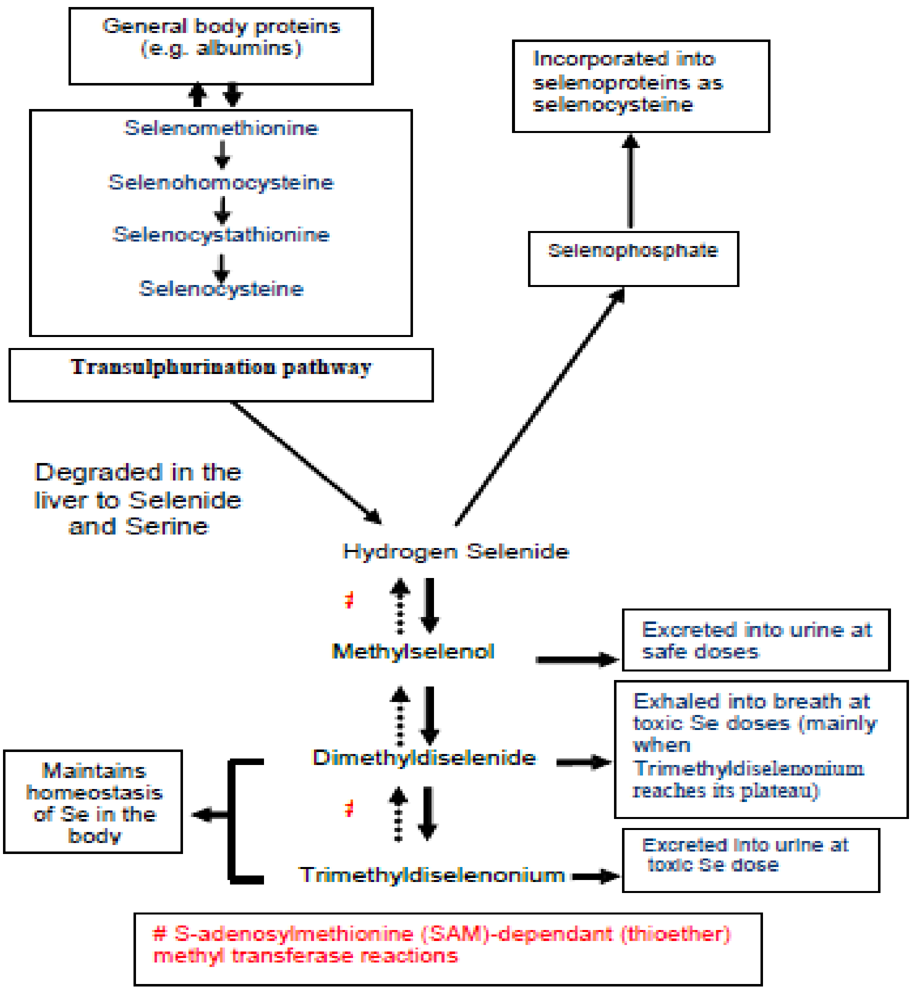
يستخدم قسم من السيلينيد الناتج عن استقلاب السيلينيوم (سواء العضوي أو اللاعضوي) لتشكيل السيلينوسيستين والذي بدوره يستخدم لتصنيع السيلينوبروتين selenoprotein ، والقسم الآخر يخضع لعملية متيلة methylated ويطرح عن طريق الرئة أو الكلية [35] .



الشكل (3) استقلاب السيلينيوم [34]

3.6 الإطراح Elimination :

يطرح السيلينيوم بشكل أساسي عن طريق البول (الكلى) بشكل أيون ثلاثي ميتيل السيلينيوم Trimethylselenonium ion$(CH_3)_3Se^+$. كما يطرح قسم منه عن طريق هواء الزفير(الرئتين) بشكل ثنائي ميتيل سيلينيد Dimethyl Selenide **CH^3---- Se ---- CH^3** وثنائي ميتيل ثنائي سيلينيد Dimethyl Diselenide **CH^3---- Se---Se ---- CH^3** و هذين المركبين هما المسؤولان عن رائحة الثوم الشديدة في هواء الزفير لدى الأشخاص المستهلكون كميات زائدة من السيلينيوم . يتم طرح السيلينيوم بصورة أقل عن طريق البراز والجلد [35-31]. يوضّح الشكل (4) حركية السلينيوم في جسم الإنسان (امتصاص – استقلاب – إطراح) [37-15].



الشكل (4) حركية السلينيوم في جسم الإنسان (امتصاص – استقلاب – إطراح) [37-15]

7

أهمية السيلينيوم
Selenium importance

اكتشف دورالسيلينيوم كعنصر غذائي أساسي عام 1957 من قبل العالمان شفارتز وفولتز **Schwarz and Foltz** حيث أشارا إلى أن السيلينيوم عنصر ضروري لصحة الإنسان وذلك بعدما اكتشفا بأن كميات زهيدة من السيلينيوم تقي من التنخر الكبدي liver necrosis عند فئران التجربة [39-38] .

وقد اتضحت في السنوات الأخيرة أهمية معدن السيلينيوم الحيوية لجسم الإنسان والحيوان على السواء ، فهو ضروري لوظائف الجسم الحيوية ، وله أهمية فيزيولوجية واسعة .
ويعتبر حالياً من المغذيات الزهيدة الضرورية Essential micronutrient في غذاء الإنسان والحيوان [40] ، وإن نقصه يؤدي إلى اختلال الوظائف الحيوية للجسم وخصوصاً في حال نقص فيتامين E [41] ، وكذلك في حالة التسمم بالرصاص والكادميوم [42]. وهناك بعض الأمراض تم إثباتها على الإنسان الذي يسكن في المناطق الفقيرة بالسيلينيوم والتي تنتج عن عوز السيلينيوم (مثل : أمراض القلب وقصور الدرق وضعف في جهاز المناعة وأمراض الجهاز العصبي وأمراض السرطان الخبيث) [44-43]. وكذلك عندما يوجد السيلينيوم في أغذية الحيوانات بتراكيز أقل من 0.1 ppm تظهر أعراض النقص (هذا يتضمن بشكل أساسي مرض العضلات البيضاء White muscle disease ومرض تيبس الخروف Stiff lamp disease [45] .

لذا قررت الهيئات المسؤولة في أمريكا وكندا (Standing Committee on the Evaluation of Dietary Reference Intakes of the Food and Nutrition Board , Institute of Medicine , the National Academies and Health Canada) إضافة معدن السيلينيوم إلى غذاء الإنسان والحيوان [46-36] ، حيث أصبح هذا المعدن مطروحاً للاستخدام على شكل مستحضرات (متممات غذائية) تحتوي مزيجاً من الفيتامينات ، مضافاً إليها بعض المعادن الهامة لجسم الإنسان ، ومنها معدن السيلينيوم ، حيث أضيف بمقدار µg (25-200) في الكبسولة أو المضغوطة الواحدة[47-15] .

كذلك تتم إضافته إلى الأسمدة في بعض الدول لجعل الغذاء أكثر غنى بالسيلينيوم عن طريق امتصاصه مباشرة من قبل النباتات المزروعة في هذه التربة والتي يتغذى منها الإنسان مباشرة أو تتغذى منها الحيوانات والتي تستعمل لحومها أو منتجاتها المختلفة في الغذاء البشري [48] .

تتوجه الأنظار حالياً إلى دور السيلينيوم في مختلف العمليات الاستقلابية في جسم الإنسان وتبرز أهميته من كونه :

- **<u>ضروري لعمل الأنزيمات المعتمدة على السيلينيوم والمعروفة بالبروتينات السيلينية selenoproteins</u>** :

حيث أنه خلال تصنيع هذه البروتينات يندمج السيلينوسيستين (selenocysteine) بموقع خاص جداً very specific location في تسلسل الحموض الأمينية بهدف تشكيل بروتين وظيفي . هناك 25 بروتين سيليني على الأقل تم تحديدهم والتعرف على وظائفهم [49-50].

ومن أهم هذه البروتينات السلينية :

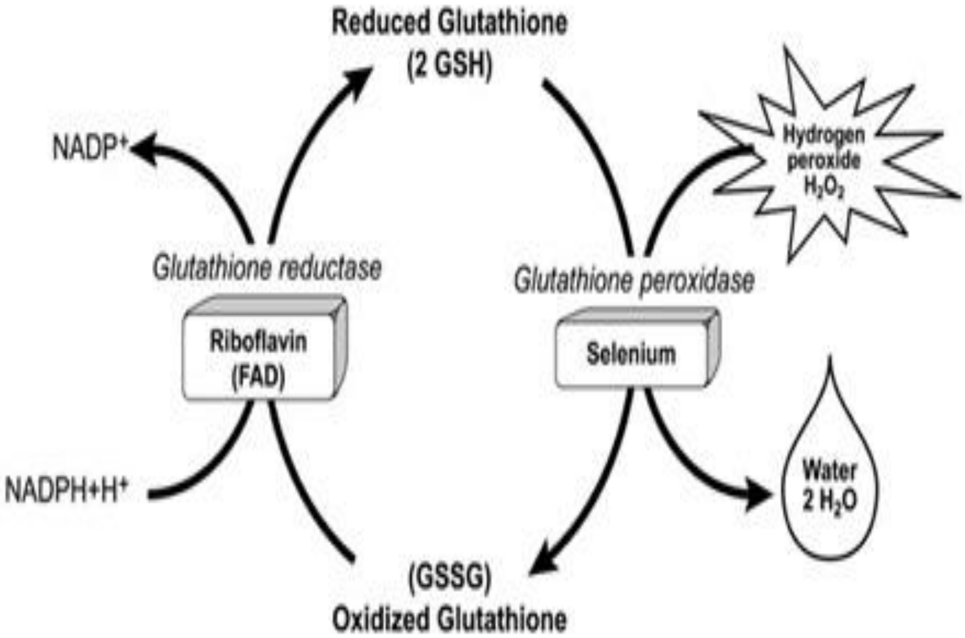
- **غلوتاتيون بيروكسيداز *Glutathione peroxidases*** :

هناك 5 أنواع من الغلوتاتيون بيروكسيداز التي تحتوي على السيلينيوم تم تحديدها وهي [49] :

- الغلوتاتيون بيروكسيداز الخلوية أو الكلاسيكية **cellular or classical GPx**
- الغلوتاتيون بيروكسيداز البلازمية أو الخارج خلوية **plasma or extracellular GPx**
- الغلوتاتيون بيروكسيداز الفوسفوليبيد هيدروبيروكسيدية **phospholipid hydroperoxide GPx**
- الغلوتاتيون بيروكسيداز المعوية –المعدية **gastrointestinal GPx**

على الرغم من أن كل نوع من الغلوتاتيون بيروكسيداز السابقة الذكر ه و بروتين سيليني مستقل بذاته ، ولكن جميعها تعمل كأنزيمات مضادة للأكسدة التي من شأنها أن تخفض الضرر الناتج عن أنواع الأوكسجين الفعال – فوق الأكاسيد peroxide - (ROS) (مثل :الهيدروجين بيروكسيداز و الليبيد هيدروبيروكسيداز) وترجعها إلى منتجات غير مؤذية لجسم الإنسان . كما هو موضح بالشكل (5) ، حيث نلاحظ أن كل جزئية من الهيدروجين بيروكسيداز ترجع إلى جزيئتين من الماء في الوقت الذي تأكسد به جزيئتين من الغلوتاتيون بتفاعل تحفيزي يتواسطه أنزيم السيلينو selenoenzyme - الغلوتاتيون بيروكسيداز .

إن الغلوتاتيون المؤكسد يمكن أن يرجع بتواسط أنزيم الغلوتاتيون بيروكسيداز (الأنزيم المعتمد – فلافين أدنين دي نيوكليوتيد FAD - dependent enzyme)، بالتالي يحمي الجسم من تراكم فوق الأكاسيد العضوية في الخلية [51].



الشكل (5)حلقة الإرجاع والأكسدة للغلوتاتيون (ريدوكس)

♦ **تيوريدوكسين ريدوكتاز *Thioredoxin reductase* :**

عندما يتم الاقتران مع مركبات التيوريدوكسين ، يقوم التيوريدوكسين بتفعيل العديد من مضادات الأكسدة (مثل Vit.C) . إن بقاء التيوريدوكسين بالشكل المُرجَع بواسطة التيوريدوكسين ريدوكتاز ضروري لتنظيم نمو الخلايا وتكاثرها [52] .

♦ **أيودوثيرونين دي أيوديناز (دي أيوديناز هرمون الدرق) *Iodothyronine deiodinases (thyroid hormone deiodinases)* :**

تفرز غدة الدرق كميات قليلة جدا من هرمون الدرق الفعال حيويا (triiodothyronine or T_3) وكميات كبيرة من هرمون الدرق بشكله الغير فعال (T_4 thyroxine or) إلى الدوران . إن النسبة العظمى من هرمون الدرق الفعال حيويا (T_3) في الدوران وداخل الخلايا يتشكل من نزع ذرة يود من الشكل غير الفعال لهرمون الدرق (T4) بتفاعل يتواسطه أنزيم أيودوثيرونين دي أيوديناز المعتمد على السيلينيوم (يوجد ثلاثة أنماط منه types I, II, and III يمكنها أن تفعَل أو تبطل فعالية هرمون الدرق بتأثيرها على T3, T4) . وبالتالي يعتبر السيلينيوم معدن ضروري للنمو والتطور والاستقلاب الخلوي من خلال دوره في تنظيم هرمونات الدرق [53] .

♦ **سيلينوبروتين P (*Selenoprotein P*) :**

يتواجد هذا البروتين في البلازما كما يتواجد أيضاً مرتبط مع الخلايا البطانية الوعائية (هذه الخلايا تبطن الجدران الداخلية للأوعية الدموية) . يعمل هذا البروتين بشكل رئيسي كبروتين ناقل للسيلينيوم ، كما يعمل كمضاد أكسدة يحمي الخلايا البطانية من الأذية الناتجة عن مركبات كالبيروكسي نترات peroxynitrite أنواع الآزوت التفاعلي (RNS) [54] .

♦ **سيلينوبروتين W (*Selenoprotein W*) :**

يتواجد هذا البروتين في العضلات . على الرغم من أن وظيفته غير معروفة بشكل دقيق ولكنه يعتقد أنه يلعب دوراً بعملية الاستقلاب في العضلات. هناك تماثل بنسبة 80% في هذا البروتين المعزول من ستة أنواع مختلفة من الحيوانات[55].

<u>للسيلينيوم دور هام في الوقاية من بعض الأمراض :</u>

♦ **وظيفة مناعية Immune function :**

إن الخلل في الوظيفة المناعية مرتبط بنقص السيلينيوم في جسم الإنسان ، حيث تبين أن تناول المتممات الغذائية الحاوية على السلينيوم عند الأشخاص الذين تظهر عليهم أعراض نقص السلينيوم يؤدي إلى تحفيز الاستجابة المناعية لديهم[56].
أظهرت دراسات أجريت على أشخاص أصحاء [57] وأشخاص مثبطين مناعيا [58] تم إعطائهم متمم غذائي يحوي السيلينيوم (بشكل سيلينيت الصوديوم) بتركيز 200 مكغ/يوميا لمدة 8 أسابيع ، تحسّن في استجابة الخلايا المناعية لمستضدات غريبة foreign antigens مقارنة مع الأشخاص الذين تم إعطائهم الغُفل placebo (متمم غذائي لايحوي السيلينيوم) . كما أكدت دراسات عديدة أن للسيلينوم دور في تنظيم التعبير لإشارة الخلية cell-signaling لجزيئات تدعى السيتوكينات cytokines المسؤولة عن تنظيم الاستجابة المناعية[59] .

♦ **العدوى الفيروسية Viral infection :**

أظهرت الدراسات أنّ عوز السلينيوم يؤدي إلى زيادة الفوعة virulence أو تفاقم العدوى الفيروسية. إن زيادة الشدة التأكسدية الناتج عن نقص السيلينيوم بجسم الإنسان يؤدي إلى حدوث طفرة أو تغيير في التعبير الجيني للفيروسات[60] .

♦ السرطان Cancer :

الدراسات على حيوانات التجربة Animal studies :

أثبتت أدلّة كثيرة أنّ تناول متممات غذائية تحوي السلينيوم بتراكيز عالية تخفض من نسبة حدوث السرطان عند حيوانات التجربة .

أُجريت أكثر من 100 دراسة على أنماط مختلفة من الحيوانات المصابة بالسرطان (سواء كان سواء كان سبب إصابتها ذاتية spontaneous أو فيروسية viral , أو كيماوياً chemically) ، ووجد في أكثر من ثلثي هذه الدراسات أن تناول متممات غذائية تحوي السيلينيوم يخفض انتشار الورم tumor incidence بشكل ملحوظ [61] . أثبتت الدراسات أن الأشكال المُؤمْـتلة methylated من السيلينيوم هي الأنواع الفعّالة ضد الأورام ، وهذه المركبات المُـؤمْـتلة من السيلينيوم يتم انتاجها بشكل كبير بالجسم عندما يكون هناك فائض بكمية السيلينيوم الواردة excess selenium intakes . هناك دراسات بينت العلاقة بين الوارد من السيلينيوم ومرض السرطان عند الإنسان والعلاقة بين الشكل الكيميائي للسيلينيوم وحدوث الورم to tumor incidence في الحيوانات [62] .

الدراسات الوبائية Epidemiological studies :

أثبتت الدراسات الجغرافية أن معدل الوفيات بالسرطان يكون أعلى في المناطق ذات التربة المنخفضة المحتوى من السلينيوم ومعدل منخفض نسبيا من الوارد الغذائي من السلينيوم . أظهرت نتائج الدراسات الوبائية أن الأفراد الذين لديهم تراكيز منخفضة من السيلينيوم بأجسامهم (الدم والأظافر) يكون معدل حدوث السرطان لديهم مرتفع [63] .

يعتبر التدخين و الإصابة بالتهاب الكبد من عوامل الخطورة التي تزيد معدل الإصابة بالسرطان بأشكاله المختلفة ، وإن انخفاض الوارد الغذائي من السيلينيوم قد يزيد من هذه الخطورة .

أُجريت دراسة على رجال تايوانيين شخصت لديهم إصابة مزمنة بالتهاب الكبد B وC Hepatitis B&C ، أظهرت أن معدل الإصابة بسرطان الكبد يتناسب عكسياً مع التركيز البلاسمي للسيلينيوم . ويزداد هذا التناسب العكسي عند الأشخاص المدخنين والذين لديهم تراكيز بلاسمية منخفضة من فيتامين A [64] .

توصّلت أكثر من 16 دراسة إلى أنّ معدل الإصابة بسرطان الرئة يزداد بانخفاض مستويات السيلينيوم بالجسم ، حيث أوضحت أن للسيلينيوم دور هام في الوقاية من سرطان الرئة [65].

كما أظهرت 20 دراسة وبائية أن تراكيز السيلينيوم بالمصل والأظافر يكون منخفضاً بشكل ملحوظ لدى الأشخاص المصابون بسرطان البروستات prostate cancer [66].

- **أمراض القلب الوعائية Cardiovascular disease :**

أظهرت دراسة أجريت على مرضى قلب وأوعية أن معدل الإصابة بأمراض القلب والأوعية وحدوث الوفيات نتيجة هذا المرض يزداد لدى الأشخاص الذين لديهم مستويات السيلينيوم في المصل أقل من 45 مكغ/لتر مقارنة بأشخاص أصحاء لديهم مستويات السيلينيوم في المصل أعلى من 45 مكغ/لتر [67]. وفي دراسة أخرى ، أظهرت أن معدل الوفيات نتيجة الاحتشاء القلبي يزداد عندما تكون مستويات السيلينيوم في المصل منخفضة [68].

أجريت دراسات بعدّة مراكز للأبحاث في أوروربا ، أظهرت أن معدل الإصابة بالنوبات القلبية Heart Attack يزداد بانخفاض مستويات السيلينيوم في الجسم (خاصة الأظافر) [69] .

- **السكري النمط 2 Type 2 Diabetes :**

أظهرت دراسة أجريت على مرضى مصابين بالسكري النمط Type 2 ، أنّ مستويات السيلينيوم في الجسم (خاصة الأظافر) تكون منخفضة بشكل ملحوظ مقارنة بالأشخاص الغير مصابين بالسكري النمط 2 Type [70] .

في عدة تجارب أجريت لدراسة التأثير الواقي للسيلينيوم وفيتامين E من السرطان ، أظهرت أن إعطاء السيلينيوم بمقدار 200 مكغ/ يومياً (بشكل مستمر لمدة 5 سنوات) يقلل خطر الإصابة بالسكري النمط 2 Type [71] .

- **التهاب المفاصل Arthritis :**

أكدت عدة دراسات أنّ الأشخاص المصابين بالتهاب المفاصل الروماتيدي Rheumatoid Arthritis, (مرض مزمن يسبب ألم pain ، تيبّس stiffness ، تورّم swelling وفقدان لوظيفة المفاصل) تكون لديهم مستويات منخفضة من السسيلينيوم بالدم . كما أظهرت دراسات أخرى أنّ بعض الأشخاص المصابين بالتهاب المفاصل الروماتيدي يكون الوارد من السيلينيوم لديهم منخفض[72].

يقوم الجهاز المناعي في الجسم بتشكيل جذور حرة من شأنها أن تساعد في تدمير العضويات التي تغزو الجسم و تدميرالأنسجة التالفة ، ولكن من الممكن أيضاً أن تؤثر بذلك على الأنسجة السليمة . وهنا تكمن أهمية السلينيوم من كونه مضاد أكسدة يخفف أعراض التهاب المفاصل من خلال التحكم بمستويات الجذور الحرة المتشكلة ، وبالتالي يقي الأنسجة السليمة منها [73] .

- **نفص المناعة المكتسبة - الإيدز HIV / AIDS :**

أظهرت دراسات [74-59] أنّ هناك ارتباط فريد من نوعه بين السيلينيوم وفيروس نقص المناعة HIV المسبب لمتلازمة نقص المناعة المكتسبة AIDS . حيث أن الإنخفاض الملحوظ بمستويات السيلينيوم لدى الأشخاص المصابين بفيروس نقص

المناعة HIV يعتبر من المؤشرات الحساسة لتفاقم المرض وشدّته. إن ارتفاع معدل الخطورة للموت بمرض الايدز مرتبط بشكل ملحوظ بانخفاض مستويات السيلينيوم المصلية.

كما أظهرت الدراسات أنّ تناول متممات غذائية حاوية على السلينيوم وبشكل كافي يمكن أن يزيد مقاومة الجسم اتجاه فيروس الإيدز ، من خلال تحسين وظيفة خلايا الجهاز المناعي الهامة والمعروفة بالخلايا اللمفاوية التائية T lemphocells وتنظيم إفراز السيتوكينات cytokines [74-59] .

يكمن الدور الهام للسيلينيوم في الوقاية من مرض الإيدز من خلال إنقاص الشدّة التأكسدية **oxidative stress** في الخلايا المصابة بفيروس HIV وبالتالي يثبط معدل الاستنساخ لفيروس نقص المناعة HIV [74].

في دراسة أجريت على 186 مريض مصاب بفيروس نقص المناعة HIV وجد أنّ إعطاء السيلينيوم بمقدار 200 مكغ يومياً لمدة عامين يقلل من معدل إدخال المريض للمستشفى للمعالجة **Hospitalization** [75] .

8

الحاجة اليومية من السيلينوم

Recomeneded Dietary Allowance (RDA) of Selenium

تزداد الحاجة اليومية من السيلينيوم (RDA) مع تقدم عمر الإنسان ، فقد حددت هيئة الغذاء والتغذية للمركز الوطني للأبحاث (الأكاديمية الوطنية للعلوم)
The Food and Nutrition Board of the National Research Council (NAS 2000)
الحاجة اليومية المنصوح بها من السيلينيوم تبعا ً للعمر كما هو موضح في الجدول (3) [77-76] :

الجدول (3) الحاجة اليومية من السيلينيوم تبعاً للعمر

Recomeneded Dietary Allowance (RDA) for selenium الحاجة اليومية المنصوح بها من السيلينيوم	
العمر	**مكغ / اليوم**
الرضع 0-6 شهور	15
الرضع 7-12 شهور	20
الأطفال 1-3 سنوات	20
الأطفال 4-8 سنوات	30
الأطفال 9-18 سنوات	40
البالغين 19 سنة ومافوق	55
الحامل	60
المرضع	70

9

نقص السيلينيوم
Selenium deficiency

1.9 أسباب نقص السيلينيوم :

نادراً ما يُلاحظ نقص السيلينيوم عند الأشخاص الأصحاء السويّين التغذية . حيث يحتاج جسم الإنسان لكميات زهيدة من هذا المعدن . هناك عدة أسباب لعوز السيلينيوم : [78]

- عندما تكون كمية الوارد من السيلينيوم غير كافية نتيجة سوء التغذية عند الإنسان (الأغذية المعالجة refined and processed food تكون مستويات السيلينيوم بها منخفضة) [2] .
- نقص كميات السيلينيوم المتواجدة بالغذاء ، وهذا مرتبط بانخفاض كمية السيلينيوم في التربة [78] .
- تتدخّل عدة عوامل قد تكون من شأنها إنقاص تركيز السيلينيوم في الجسم مثل الفيتامينات والمعادن الأخرى ، ومثال على ذلك معدن الرصاص (Pb) حيث يتفاعل مع السيلينيوم ويؤدي إلى انقاص تركيزه بشكل كبير في الأنسجة. أيضا معدني النحاس والحديد كلاهما يثبطان امتصاص السيلينيوم في الأمعاء [78-79] .
- عندما ينخفض مستوى الحمض الأميني - المتيونين في الجسم فإن ذلك يؤدي لانخفاض توافر السيلينيوم الحر في الجسم ، وذلك لأن المتيونين يرتبط بالسيلينيوم ويشكل مركب السيلينومتيونين Seleno-methionine الذي يرتبط ببروتينات الجسم وهذا من شأنه تخفيض توافر السيلينيوم الحر في داخل الجسم [78-79] .
- تناذرات سوء الامتصاص – متلازمة الأمعاء القصيرة – أمراض الأمعاء الإلتهابية ، تترافق جمعيها بنقص قدرة الأمعاء على امتصاص السيلينيوم أو زيادة طرحه [80] .
- ينخفض مستوى السيلينيوم في الجسم بحالة زيادة الشدة التأكسدية الناتجة عن نقص فيتامين E (Vit.E) في الجسم [81] .
- بعض الأدوية قد تكون مسؤولة عن عوز السيلينيوم مثال : المعالجة باستخدام الستيروئيدات بجرعات عالية يؤثر على امتصاص السيلينيوم [81] .

2.9 المعرضون لخطر نقص السيلينيوم :

تتعرض مجموعة كبيرة إلى خطر نقص السيلنيوم السريري ومنها :

- المرضى المزمنين الذين يخضعون لتغذية كاملة بالحقن (TPN) [وهي طريقة متبعة لتغذية المرضى عن طريق الوريد عند توقف جهاز الهضم عن العمل] بدون إضافة السيلينيوم لفترات طويلة من الزمن [82] .
- عند المرضى الذين يعانون من ضعف بالعضلات Muscular weakness ، تلف العضلات muscle wasting والقلب cardiomyopathy (التهاب وخلل في عضلة القلب) [83-36] .
- الأشخاص المصابون بالإسهالات المزمنة والذين لديهم مشاكل معدية معوية (كالمرضى المصابون بداء كرون Crohn's disease) ، والمرضى الذين خضعوا لاستئصال جراحي لجزء كبير من المعي الدقيق ، حيث أن جميع هؤلاء المرضى يكون امتصاص السيلينيوم لديهم أقل ما يمكن [84] .
- الأشخاص الذين يخضعون لحميات صحية خاصة والمُستخدمة لعلاج الاضطرابات الأيضية metabolic disorders (كما في حالة فينيل كيتون يوريا phenylketonuria (PKU)) [36].
- الكهول نظراً لنقص الوارد الغذائي ونقص امتصاص السيلينيوم [85] .
- الأشخاص المعتمدون في تغذيتهم على نباتات تنمو في تربة فقيرة بالسيلينيوم[86] .
- المدخنين والكحوليين ، يتعرضون بشكل كبير لمشاكل نقص التغذية [87] .
- الأشخاص النباتيون [88] .

3.9 أعراض نقص السيلينيوم :

يظهر نقص السيلينيوم عندما يكون الوارد اليومي منه أقل من 40 – 45 مكغ . أكّد الباحثون أنّ انخفاض مستويات السيلينيوم في الجسم يؤدي إلى إضعاف الجهاز المناعي للجسم وهذا مايجعله أكثر عرضة للإصابة بأمراض عديدة [89] .

<u>أهم أعراض نقص السيلينيوم هي :</u> [41-43]

- ألم ووهن بالعضلات .
- فقدان لون الشعر والجلد .
- ابيضاض في سرير الظفر nail beds .
- اضطرابات معدية- معوية ، إسهالات .
- أمراض كبدية (تليف الكبد) .
- رائحة هواء الزفير كرائحة الثوم .
- نقص في المهارات العقلية (بطئ في الاستيعاب ، خمول ذهني ، قلة التركيز ، صعوبة تذكر) .
- هشاشية خلايا الدم الحمراء .
- ارتفاع ضغط الدم .
- اضطرابات عصبية (تقلب بالمزاج) .
- التهاب المفاصل الرثوي .
- التصلب العصيدي والذي يزيد خطر الإصابة بأمراض القلب وأمراض الشريان التاجي .
- أظهرت الدراسات وجود علاقة بين انخفاض مستويات السيلينيوم وحدوث السرطانات ، وخاصة سرطان الرحم والمهبل ، الأمعاء والمعدة والبروستات .
- مرض كيشان Keshan disease : وهو مرض فيروسي قاتل (مميت) يحدث نتيجة نقص السيلينيوم في النظام الغذائي خاصة عند الأطفال والنساء الحوامل ، أهم أعراض هذا المرض الفشل القلبي heart failure ، حدوث التهاب بعضلات القلب وعدم انتظام ضربات القلب ، وذمة رئوية ويجعل الجسم عرضة للأمراض [90] .

- مرض كاشين- بيك Kashin-Beck disease : مرض يحدث نتيجة عوز السيلينيوم كما يحدث أيضاً نتيجة عوز اليود ، أهم أعراض هذا المرض أنه يؤدي إلى توقف عمل (تعطيل disabling) المفاصل وضمور atrophy النسيج الغضروفي ، حيث يؤدي إلى توقف النمو وتنخر necrosis وضمور النسيج المفصلي والغضروفي وحدوث تشوه في المفاصل) [41] .
- قصور الدرق Hypothyroidism : أشارت الأبحاث إلى أن عوز السيلينيوم يؤثر على مستوى اليود في الدرق ، حيث أنه ينقص مستوياته على مستوى الدرق مؤدياً بذلك لقصور الدرق . أهم أعراضه : الإرهاق ، الخمول الدائم ، الاكتئاب ، الإمساك ، زيادة في الوزن ، تضخم الدرق(الدراق) goiter ، القماءة cretinism(هي نقص التطور بسبب درقي يؤدي لحدوث تخلف عقلي) ، فقدان الشعر ، وحدوث الإجهاضات المتكررة [41] .

10

سمية السيلينيوم

Selenium Toxicity

لعلّ حادثة Marco polo الشهيرة التي حدثت منذ مئات السنين تشرح سمية السيلينيوم ، فقد أُصيبت خيوله عام 1295 عند دخوله الصين وبعد بضع أيام حيث بدأت تتخرب حوافرها ويتساقط شعرها وتحدث لها ضائعات بشكل متطور بعد أن كانت تتغذى على نبات Astragalus (نبات من فصيلة البقوليات يراكم السيلينيوم بتراكيز عالية جداً في أنسجته) في منطقة تركستان فقد تبين حديثا أن هذه النباتات غنية جداً بالسيلينيوم وهي سامّة للإنسان والحيوان [91] .

وفي 19 إبريل من عام 2009 تكرر الحادثة نفسها ، حيث 21 مهر من مهور بولو بدأت تموت قبل بداية المباراة بفترة قصيرة والتي جرت في الولايات المتحدة الأمريكية . بعد ثلاثة أيام من الفحص الطبي تبين أن المهور أعطيت جرعات عالية من السيلينيوم عن طريق الحقن ، حيث وجد أن تركيز السليلينيوم أعلى بـ 10-50 مرة من الحالة الطبيعية بعينات الدم ، وأعلى بـ 15-20 مرة بعينات أخذت من الكبد [92] .

وفي عام 1984 حصلت في الولايات المتحدة الأمريكية حادثة تسمم بالسيلينيوم لدى 13 شخص ، وذلك نتيجة تناول متممات غذائية تحوي السيلينيوم بتراكيز عالية جداً ، حيث أدى ذلك لأعراض شديدة من غثيان وإقياءات ، تعب ووهن عام ، تساقط بالشعر والأظافر . تبين بعد ذلك أن هذه المتممات الغذائية التي تم تناولها تحوي السيليلينيوم بتركيز أعلى بـ 182 مرة من التركيز المصرح به على علب هذه المتمات نتيجة خطأ بالتصنيع[93] .

إنّ زيادة كمية السيلينيوم في الجسم تؤدي إلى إحلاله محل الكبريت في كثير من مركبات الخلية ، لأن مركبات السيلينيوم أقل ثباتاً وأكثر نشاطاً من المركبات الكبريتية المقابلة ، وبالتالي فإن هذا يؤثر على وظائف الخلية [94] .

نتيجة لظهور أعراض التسمم المزمن بالسيلينيوم على الحيوانات فقد أجريت دراسات إحصائية على السكان في ولاية جنوب داكوتا أثبتت أن الإنسان المغذى على وجبات غذائية تحتوي كميات كبيرة من هذا العنصر ظهرت عليه عوارض تسمم تجلت في ظواهر أهمها سقوط الشعر وتكسر الأظافر وظهور رائحة الثوم في هواء الزفير [95] .

ومن أهم ظواهر التسمم التي تظهر على الحيوانات وهن الجسم وتقلص الأقدام وسقوط الشعر والتخبط في المشي نتيجة ضعف الرؤية والعمى وضعف القدرة على التكاثر وتليف الكبد وتساقط الحوافر [91-96].

أما أعراض التسمم عند الإنسان فتتجلى بظواهر أهمها: [97-98]

- سقوط الشعر .
- آفات فروة الرأس والجلد .
- تكسر الأظافر ، بقع بيضاء على الأظافر .
- ظهور رائحة الثوم في هواء الزفير .
- اضطرابات هضمية من غثيان وإقياء واسهالات حادة وتهيجات معوية .
- تعب ووهن عام .
- تشنج العضلات وألم بالمفاصل .

- أذية عصبية من خدر وفرط منعكسات قد تصل بالنهاية للشلل .
- بالتراكيز العالية جدا تؤدي إلى تليف الكبد ووذمة رئوية تنتهي بالموت .

إن التراكيز المرتفعة من السيلينيوم بالدم (أعلى من 100 µg/dL) يؤدي للتسمم بالسيلينيوم Selenosis [99] . وغالباً تظهر الأعراض السريرية للتسمم بالسيلينيوم عند الإنسان عندما يزيد التعرض المزمن عن 900 مكغ [89].

حدد المعهد الطبي للأكاديمية الوطنية للعلوم

The Institute of Medicine of the National Academy of Sciences

والمعهد الطبي لمجلس التغذية والغذاء في الولايات المتحدة

The Food and Nutrition Board (FNB) of the Institute of Medicine

واللجنة العلمية الأوروبية للغذاء

The European Scientific Committee on Food (SCF) ،

ومجموعة الخبراء البريطانيين للفيتامينات والمعادن

The United Kingdom Expert Group on Vitamins and Minerals (EVM)

مستويات التحمل العليا المأخوذة Tolerable Upper Intake Levels (ULs) من السيلينيوم عند الرضع والأطفال والبالغين كما في الجدول (4) : [100]

الجدول (4) مستويات الحمل العليا المأخوذة من السيلينيوم

Tolerable Upper Intake Levels (ULs) for Selenium **مستويات التحمل العليا المأخوذة من السيلينيوم**	
مكغ / اليوم	العمر
45	الرضع 0- 6 شهور
60	الرضع 6-12 شهور
90	الأطفال 1- 3 سنوات
150	الأطفال 4- 8 سنوات
280	الأطفال 9- 13 سنوات
400	المراهقين 14- 18
400	البالغين 19 وما فوق
400	الحامل
400	المرضع

11

تداخلات السيلينيوم
Selenium Interaction

1.11 التدخلات مع المواد المغذية : Nutrient interactions

- **المواد المغذية المضادة للأكسدة (Antioxidant nutrients)** :

بما أن السيلينيوم يدخل بتركيب أنزيمات الغلوتاتيون بيروكسيداز والثيوريدوكسي ريدوكتاز ، فهو يتفاعل مع المغذيات التي تؤثر على توازن عملية الأكسدة – الإرجاع في الخلايا (توازن مؤكسد /مضاد أكسدة) . مثال على تلك المغذيات : المعادن التي تعتبر مكون هام من مكونات الأنزيمات المضادة للأكسدة ، منها النحاس (كسوبرأوكسيد ديسموتاز) ،الزنك (كسوبر أوكسيد ديسموتاز) والحديد (كالكاتالاز).

كما يقوم السيلينيوم كغلوتاتيون بيروكسيداز بدعم فعالية فيتامين E (α- توكوفيرول) في الحد من أكسدة الدسم . أكدت دراسات أجريت على الحيوانات أن السيلينيوم يحمي من التخرب الناتج عن نقص فيتامين E في حالات الشدة التأكسدية [101] .

بالإضافة لدور السيلينيوم كثيوريدوكسين ريدوكتاز بالمحافظة على بقاء الوظفية المضادة للأكسدة لفيتامين C من خلال تحفيز تجدده من الشكل المؤكسد (حمض دي هيدروأسكوربيك) [54] .

- **اليود (Iodine)** :

يلعب السيلينيوم و اليود دوران مهمان في تنظيم استقلاب الهرمونات الدرقية مما يشير لوجود علاقة معقدة بين المركبين. اختلفت النظريات المتعلقة بالتداخلات الحاصلة بين المركبين ، فمن جهة تشير بعض الدراسات إلى أن نقص مستويات السيلينيوم تؤدي الى زيادة التأثيرات الجانبية الناتجة عن نقص اليود في الجسم حيث إن المستويات البلازمية لهرمون TSH إضافة إلى وزن الغدة الدرقية ترتفع عند وجود نقص في اليود ، وتزداد هذه الاعراض شدة عند وجود نقص مصاحب للسيلينيوم. لكن من جهة أخرى أثبتت الدراسات المجراة على الجرذان أن انخفاض مستويات T3 و T4 وارتفاع TSH ووزن الغدة الدرقية المشاهد في القصور الدرقي يمكن عكسه ب إنقاص مستويات السيلينيوم في الجسم.

كما أظهرت التجارب السريرية على البشر أن مشاركة السيلينيوم مع اليود في المكملات الغذائية وإعطائها لمرضى مصابين بنقص مشترك لليود والسيلينيوم يؤدي إلى ارتفاع سريع بأنزيم الغلوتاتيون بيروكسيداز المسؤوول عن معادلة الجذور الحرة الناتجة عن الـ H_2O_2 مما يسبب نقص خطير بإنتاج الـ TH الى مستويات منخفضة جدا [102] .

2.11 التداخلات مع المعادن السامة الموجودة في الأغذية :

Interaction with toxic metals in the food supply

- **الزئبق [103]:**

يقوم السيلينيوم بتخفيض سمية العديد من المعادن وذلك من خلال تشكيل معقدات السيلينيد المعدنية الغير فعال (inert metal selenide complexes) . يوجد الزئبق أو ميتيل الزئبق في الأغذية البحرية مرتبطاً مع السيلينيوم وهذا ما يحمي جسم الإنسان من سمية الزئبق . وإن هذا الارتباط غالبا ما يؤدي لانقاص التوافر الحيوي للسيلينيوم عند تناول هذه الأغذية .

- **الزرنيخ والكادميوم [104] :**

يعتبر معدني الزرنيخ والكادميوم من الملوثات البيئية والصناعية ، والتعرض لكميات زائدة من الزرنيخ والكادميوم يعرض صحة الإنسان للخطر وخاصة عند الأشخاص الذين يعيشون في مناطق مرتفعة التلوث بهذين المعدنيين . أظهرت الدراسات أن السيلينيوم يخفض من تراكم الكادميوم والزرنيخ في العضوية ، حيث أنّ له دور بالحماية من حدوث الآفات الجلدية للزرنيخ arsenic-related skin lesions . كما أظهرت عدة دراسات تأثير السيلينيوم في الشدة التأكسدية المُحْدثة بالكادميوم في مختلف الأنسجة .
يعتقد أن الآلية تعتمد على دور السيلينيوم في حجز هذه المعادن السامة داخل معقدات خلوية تبطل تأثيرها السام . كما يعتقد أن الأنزيمات المضادة للأكسدة - المعتمدة على السيلينيوم له دور ثانوي في إزالة السمية الناتجة عن الزئبق والكادميوم .

3.11 التداخلات مع الأدوية : Interaction with drugs [107-106-105]

- **الأدوية التي من شأنها انقاص مستويات السيلينيوم في الجسم :**

- Cisplatin, a chemotherapy drug
- Clozapine (Clozaril)
- Corticosteroids, such as prednisone
- Valproic acid (Depakote)

- **الأدوية التي تؤدي لزيادة النزف عند مشاركتها مع السيلينيوم :**

مضادات التخثر ومضادات تجمع الصفيحات (مميعات الدم)

Anticoagulants and antiplatelet drugs (blood thinners)

عندما تتم المشاركة بين السيلينيوم وهذه الأدوية فإن السيلينيوم يؤدي لزيادة النزف ومنها:

- Clopidogrel (Plavix)
- Warfarin (Coumadin)
- Heparin
- Aspirin

- **الأدوية التي يُطِيل السيلينيوم تأثيرها المهدئ :**

الباربيتوريات **Barbiturates**
يطيل السيلينيوم التأثير المهدئ لهذه الأدوية ، ومنها :

- Butabarbital (Butisol)
- Mephabarbital (Mebaral)
- Phenobarbital (Nembutal)

- **الأدوية التي تنخفض فعاليتها عند مشاركتها مع السيلينيوم :**

الأدوية الخافضة الشحوم **Cholesterol-lowering medications**
تقوم هذه الأدوية بإنقاص مستويات الكوليسترول السيئ (LDL) وزيادة مستويات الكوليسترول الجيد (HDL) عند المرضى المصابين بالأمراض القلبية .

إن استخدام مضادات الأكسدة الحاوية على السيلينيوم بالمشاركة مع تلك الأدوية ممكن أن يخفض من فعاليتها .

- Simvastatin (Zocor)
- Prevastatin (Pravachol)
- Niacin
- Lovastatin (Mevacor)
- Fluvastatin (Lescol)
- Atorvastatin (Lipitor)

12

الطَّرائق التَّحليليَّة المستخدمة

استخدمت عدة طرائق تحليلية لمقايسة السيلينيوم في الأوساط المختلفة [108] : المياه ، التربة ، النباتات ، شعر الإنسان ، الحليب والمتممات الغذائية ، منها مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) [109] ، مقياس الفلورة Fluorometry [109] ، مقياس الطيف الضوئي المرئي Spectrophotometry [110-109] . كما استخدمت طرائق تحليلية أخرى مثل : مطيافية الكتلة المدمجة مع البلازما التحريضية Inductively coupled plasma-Mass spectrometry (ICP-MS) لمعايرة السيلينيوم في العوالق البحرية marine plankton [111] والمصل serum [112] والبندق [113] . كما استخدمت تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High-performance liquid chromatography (HPLC) لمعايرة السيلينيوم في أغذية الأطفال [114] والبندق [113] و أوراق الشاي [115] .

ومن الطرائق التحليلية التي استخدمت لمقايسة السلينيوم في المتممات الغذائية ، نذكر منها :

1.12 مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometry :

1.1.12 المقايسة باستخدام الثيونين (Thionin) [116] :

المبدأ (Principle) :

تعتمد هذه الطريقة على القدرة المؤكسدة للسيلينيوم . حيث يتفاعل السيلينيوم مع يود البوتاسيوم في وسط حمضي لتحرير اليود . اليود المتحرر يزيل (يبيض) bleaches اللون البنفسجي لكاشف الثيونين . فعند إضافة تراكيز متدرجة من السيلينيوم إلى حجم معين ومعلوم التركيز من محلول كاشف الثيونين سيتناقص لون الكاشف ، ويكون مقدار تناقص اللون متناسباً مع تركيز السيلينيوم .

يوضح الشكل (6) جهاز مقياس الطيف الضوئي ، والشكل (7) مخططاً توضيحياً لأقسام الجهاز .

2.1.12 المقايسة باستخدام 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد (3,3Diaminobenzidine Hydrochloride) [117] :

المبدأ (Principle) :

تعتمد هذه الطريقة على تشكيل معقد ثابت أصفر اللون هو 4,3 ثنائي أمينو فينيل بيازسيلينول 3.4 Diamino Phenyl Piazselenol ناتج من تفاعل السيلينيوم الرباعي Se^{+4} مع 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد ، ثم يتم استخلاص المعقد بواسطة التولوين وتحسب شدة الامتصاص الضوئي لهذا المعقد عند طول موجة 420 نم ، حيث تتناسب شدة الامتصاص المقاسة مع تركيز السيلينيوم في المحلول .

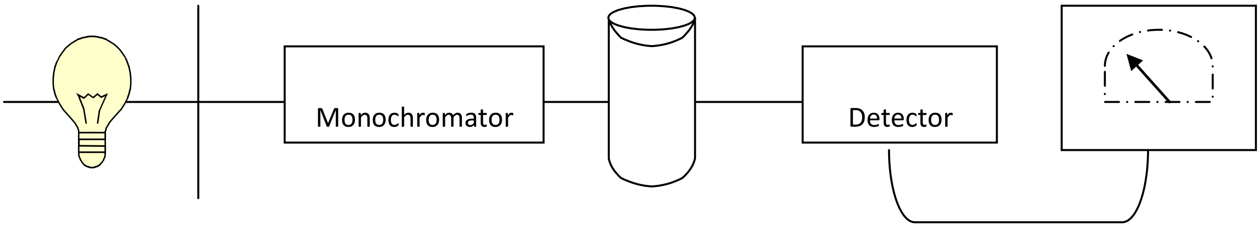
3.1.12 المقايسة باستخدام الديتيزون (Dithizon) [118] :

المبدأ (Principle) :

يشكل السيلينيوم Se^{IV} مع الديتيزون Dithizon (Diphenyl tiocarbazone) ، معقداً أصفر يستخلص بواسطة رابع كلو الكربون CCl_4 ويسمح بإجراء مقايسة لونية باستخدام مقياس الطيف الضوئي وذلك عند طول موجة 420 نانومتر ويحدد تركيز السيلينيوم في العينة من خلال المنحنى العياري .



الشكل (6) جهاز مقياس الطيف الضوئي



الشكل(7): مخطط توضيحي لأقسام مقياس الطيف الضوئي

2.12 مقياس التألق Spectrofluorimetric Method :

1.2.12 المبدأ العام للتألق [119] :

إن مبدأ مقياس التألق مبني على قياس التألق الناتج من تعريض المادة للأشعة الضوئية ثم قياس شدة الإشعاع الضوئي الذي تصدره المادة، وتتناسب هذه الشدة بحدود معينة مع عدد الجزيئات وبالتالي مع تركيز المادة.

2.2.1.12 مبدأ مقايسة السيلينيوم باستخدام 3,2 دي أمينونفتالين (DAN) [120]:

تعتمد هذه الطريقة على قياس تألق المعقد الناتج من تفاعل السيلينيوم Se^{IV} مع (DAN) 2,3-Diaminonaphtalen في وسط حمضي ذو درجة حموضة pH=3 .
تقاس شدة التألق الناتجة بطول موجة 525 نانومتر ، ويتم التحريض بطول موجة 375 نانومتر .

3.12 مقياس الطيف الضوئى بالامتصاص الذرى
Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS)

: [123-122-121]



الشكل (8) : جهاز مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري AAS

المبدأ (Principle):

يعتمد المبدأ العام لجهاز مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري على قانون كيرشوف Kirchhoff الذي ينص على : أن الذرة تستطيع امتصاص الأشعة التي تقوم هي ذاتها بإصدارها . فعندما يكتسب عنصر ما طاقةً تعطى له فانَّه سيمرُّ من الحالة الثَّابتة إلى الحالة المحرَّضة ممتصَّاً جزءاً من الطَّاقة ثم يعود إلى حالته الأصليَّة فوراً مروراً بعدَّة مراحل، يحرّر في كل مرحلة قسماً من الطاقة التي اكتسبها على شكل إشعاع، وفي المرحلة الأخيرة التي تسبق مباشرة العودة إلى حالته الأصليَّة يحرِّر العُنصر قسماً كبيراً من الطاَّقة بشكلٍ عنيف مطلقاً إياها على شكل إشعاع كبير الشِّدَّة وتَحمل اسم أشعَّة الطَّنين .

تتحقق العلاقة :

$$- \log I / I_0 = K.V.N$$

I_0 : الطاقة التي يصدرها الجسم على شكل إشعاع

I : الطاقة النافذة التي تنفذ بعد مرورها بوسط يحتوي N ذرة من العنصر نفسه الذي يعطي I_0

K : ثابتة تتعلق بطبيعة الأشعة الممتصة أي طبيعة المادة

V: تردد الطنين الذي تعطيه المادة بإخضاعها لطاقة ما

أقسام الجهاز :

يتألف الجهاز من أربعة أقسام أساسية هي :

1- مصدر للأشعة ، يوجد نوعين أساسيين :

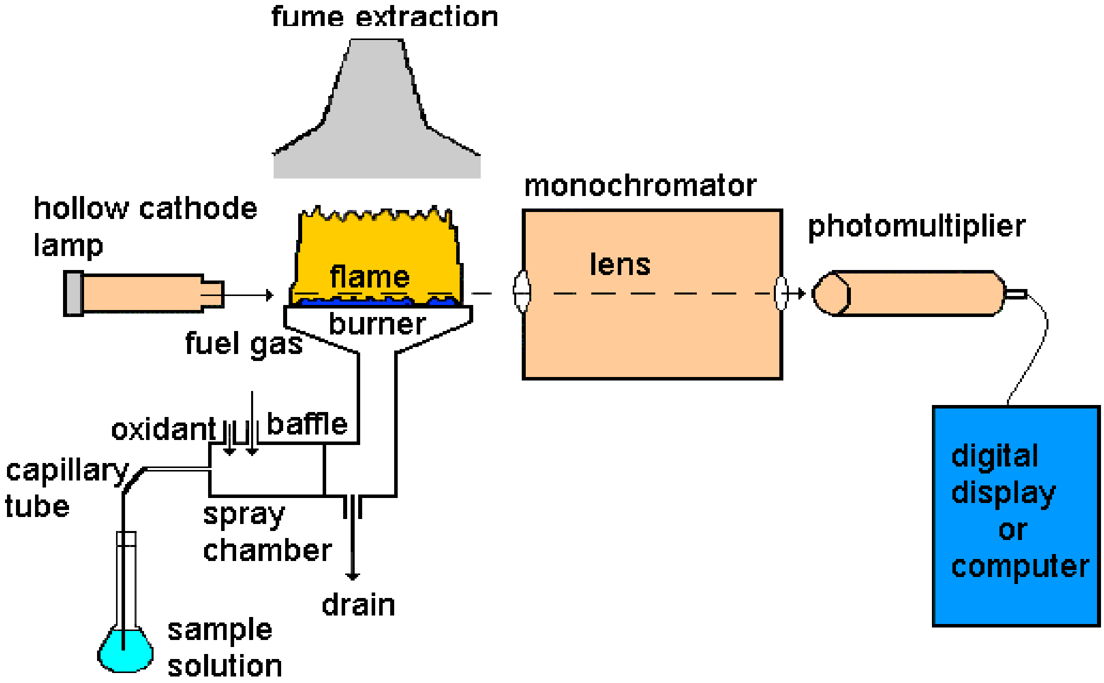
- مصباح ذو المهبط المجوف Hollow cathode lamp - HC .
- مصباح التفريغ عديم الأقطاب Electrodeless discharge lamp - EDL .

2- محول المادة لذرات حرة (موقد) باستخدام اللهب أو وسيلة أخرى باستخدام المرذاذ .

3- مستفرد طول الموجة ، مهمته فصل خط الرنين (الطنين) المطلوب .

4- خلية ضوئية مضاعفة تستخدم كمتحري .

يوضح الشكل (8) جهاز مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري ، والشكل (9) مخططاً توضيحياً لأقسام الجهاز .



الشكل (9) مخطط توضيحي لأقسام جهاز مقياس الطيف الضوئي بللامتصاص الذري

إن مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري طريقة ذات تطبيقات واسعة وهي حساسة جداً، نوعيَّة حيث يعاير كل معدن على طول موجة خاصة ومميزة له مما يمنع تدخل المعادن الشائبة الأخرى.

يحتاج تطبيق هذه الطريقة إلى تحضير سلسلة معيارية محضرة بنفس شروط المعدن وتحتاج أحياناً إلى استخدام طريقة العياري الداخلي وذلك بإضافة كمية من محلول ملح نقي للمعدن إلى العينة المراد مقايستها .

الدراسة العملية

Practical study

أجريت التجارب العملية في :

- ❖ مخبر الدراسات العليا قسم الكيمياء التحليلية ومراقبة الأغذية في كلية الصيدلة –جامعة دمشق .
- ❖ مخبر الرقابة الدوائية – وزارة الصحة .
- ❖ مخبر الرقابة الغذائية – وزارة الصحة .

أنجز هذا البحث في الفترة الواقعة بين 2010 – 2012 .

1 العينات Samples

اختيرت العينات اللازمة من المتممات الغذائية من إنتاج شركات محلية كالتالي :

الشركة المنتجة	رمز المتمم الغذائي	تركيز السيلينيوم مكغ/مضغوطة
الشركة الأولى	A	55
الشركة الثانية	B	100

وكان تركيب مضغوطات المتممات الغذائية هو كالتالي :

تركيب المضغوطة الواحدة للمتمم A

المكونات	الكمية	المكونات	الكمية	المكونات	الكمية	المكونات	الكمية
فيتامين A	800 مكغ	بيوتين	450 مكغ	كالسيوم	120 ملغ	مغنزيوم	45 ملغ
فيتامين B1	4.2 ملغ	حمض الفوليك	600 مكغ	كلور	21 ملغ	منغنيز	1.8 ملغ
فيتامين B2	4.8 ملغ	فيتامين B12	3 مكغ	كروم	25 مكغ	فوسفور	126.3ملغ
نيكوتيناميد	54 ملغ	فيتامين C	180 ملغ	نحاس	900 مكغ	بوتاسيوم	20.4 ملغ
فيتامين B5	18 ملغ	فيتامين D	5 مكغ	يود	75 مكغ	سيلينيوم	55 ملغ
فيتامين B6	6 ملغ	فيتامين E	10 ملغ	حديد	8 ملغ	زنك	8 ملغ

تركيب المضغوطة الواحدة للمتمم B

التركيب	الكمية	التركيب	الكمية
السيلينيوم	100 مكغ	فيتامين B6	220 ملغ
الزنك	15 ملغ	فيتامين C	90 ملغ
فيتامين A	1000 مكغ	فيتامين E	15 ملغ

2

طرائق الاستخلاص Extraction Methods

تعد عملية تحضير العينات من أهم مراحل العمل التحليلي ، فهي تتحكم بنتائج التحليل وبتفسير هذه النتائج . قبل إجراء القياس التحليلي للسيلينيوم الرباعي في عينات المتممات الغذائية ، لابد من هضم العينات واستخلاص السيلينيوم من هذه المتممات بحيث يمكننا معايرته مباشرة سواء بمقياس الطيف الضوئي أو بمقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري .

تم تطبيق ثلاثة طرائق لاستخلاص السيلينيوم من عينات المتممات الغذائية ، وإجراء دراسة مقارنة للطرق الثلاثة من خلال تحديد مردود Recovery وتكرارية Repeatability عملية الاستخلاص .

الطرائق المستخدمة لاستخلاص السيلينيوم من مضغوطات المتممات الغذائية :

1.2 الترميد الجاف Dry Ashing [125-124] :

1.1.2 المبدأ :

تعتمد طريقة الترميد الجاف على معاملة البقية الجافة للعينة في درجات حرارة عالية وذلك باستخدام فرن الترميد . حيث يتم معاملة مسحوق العينة بحمض الكبريت 20% في بوتقة بورسلين ثم تبخر حتى الجفاف ، ومن ثم يتم وضعها في فرن الترميد **muffle furnace** بدرجة حرارة 500^oC حيث ترفع درجة الحرارة بشكل متدرج (5 درجة مئوية/ دقيقة). تحل البقية (الرماد) الناتجة بحمض الآزوت 25% .

2.1.2 المحاليل المستخدمة :

- محلول حمض الآزوت 25% HNO_3.
- محلول حمض كلور الماء HCl 37% .
- ماء مضاعف التقطير Double Distilled Water .

3.1.2 الأجهزة المستخدمة :

- فرن ترميد من نوع Kelvin .
- سخان كهربائي من نوع Memmert .
- ميزان حساس **(Sensitive balance)** من نوع Sartorius TE64 حساسية 0.1 ملغ .

4.1.2 طريقة العمل :

يوزن 1 غرام من مسحوق عينة المتمم الغذائي (المتمم A : 35مكغ سيلينيوم /غ ، المتمم B : 100مكغ سيلينيوم /غ) وتوضع في بوتقة بورسلين ، ثم يضاف 2 مل من حمض الآزوت 25% وتمزج جيداً لضمان امتزاج كامل العينة . يجفف محتوى البوتقة باستخدام السخان الكهربائي .

عندما تجف العينة تماماً ، تنقل البوتقة إلى فرن الترميد (الشكل 10) ، ترفع درجة حرارته تدريجياً حتى الدرجة 500^{o} C لمدة ساعتين ثم تخرج البوتقة من فرن الترميد وتترك لتبرد .

يستدل على استكمال ترميد العينة الحصول على رماد أبيض . في حال احتواء الرماد أجزاء من الفحم ؛ حيث يستدل على ذلك من وجود رماد أسود ، تغسل الجوانب بالماء ثم يضاف 1 مل من حمض الآزوت 25% ويمزج جيداً ، تجفف البوتقة على السخّان الكهربائي ثم تعاد إلى فرن الترميد ذو الحرارة 500^{o} C ويترك لمدة 30 دقيقة .

تكرّر المعالجة بحمض الآزوت 25% وذلك باستخدام 1 مل منه عند كل معالجة حتى الحصول على رماد أبيض خالي من الكربون . تخرج البوتقة من فرن الترميد وتبرد ، ثم يضاف 1 مل من حمض الآزوت 25% و 5 مل من الماء المضاعف التقطير .

تسخن البوتقة على السخّان الكهربائي حتى تمام الانحلال ثم ينقل محتوى البوتقة إلى بالون معاير سعة 100 مل ويضاف 10مل حمض كلور الماء 50% ، ثم يكمل بالماء المضاعف التقطير حتى خط العيار .

يحضر الشاهد بنفس الطريقة السابقة وذلك باستخدام نفس الكميات من المحاليل والماء ويخضع الشاهد لمدة الترميد نفسها .

ملاحظة :

يجب ضمان تبخير كامل حمض الآزوت على السخان الكهربائي قبل إدخال البوتقة فرن الترميد .



الشكل(10) فرن الترميد نوع Kelvin

5.1.2 ضبط طريقة الاستخلاص : Validation of Extraction method

لضبط طريقة الاستخلاص ضمن المخبر (Interlaboratory study) ، نراعي أمرين أساسيين :

- مردود الطريقة Method Recovery .
- دقة الطريقة Method Precision .

1.5.1.2 تحديد مردود الاستخلاص :

تم تحديد مردود الاستخلاص وذلك باستخلاص كل من عينة المتمم الغذائي A والمتمم الغذائي B وتحديد الكمية الموجودة من السيلينيوم وذلك باستخدام جهاز الطيف الضوئي بالامتصاص الذري ، وبعدها يتم إضافة سيلينيوم عياري ممدد (10 ppm) (spike) بثلاثة حجوم مختلفة وتعاد عملية الاستخلاص لكل إضافة ونحسب المردود عند كل تركيز من العلاقة التالية [126] :

$$\text{المردود (Recovery)\%} = \frac{\text{الكمية المستخلصة بعد الإضافة} - \text{الكمية المستخلصة قبل الإضافة}}{\text{الكمية}} \times 100$$

وكانت النتائج كما في الجدول (5) و(6)

الجدول (5) دراسة مردود طريقة استخلاص المتمم A

الكمية المستخلصة قبل الإضافة مكغ/غ	الكمية المضافة من السيلينيوم العياري إلى 1 غ من العينة (مكغ)	الكمية الكلية المتوقعة نظرياً في 1 غ من العينة مكغ/غ	الكمية المستخلصة بعد الإضافة مكغ/غ	المردود Recovery %
26.3	6	32.3	31.6	88.3%
26.3	8	34.3	33	83.8%
26.3	10	36.3	34.97	86.7%

ويكون متوسط مردود استخلاص المتمم A : 86.3%

الجدول (6) دراسة مردود طريقة استخلاص المتمم B

الكمية المستخلصة قبل الإضافة مكغ/غ	الكمية المضافة من السيلينيوم العياري إلى 1 غ من العينة (مكغ)	الكمية الكلية المتوقعة نظرياً في 1 غ من العينة مكغ/غ	الكمية المستخلصة بعد الإضافة مكغ/غ	المردود Recovery %
90.7	6	96.7	95.9	86.7%
90.7	8	98.7	97.9	90%
90.7	10	100.7	99.32	86.2%

ويكون متوسط مردود استخلاص المتمم B : 87.6%

2.5.1.2 تحديد دقة طريقة :

لتحديد دقة الطريقة جرت دراستها على مستويين :

* التكرارية Repeatability
* الدقة الوسطى Intermediate precision

1.2.5.1.2 التكرارية (Repeatability) :

لتحديد تكرارية الطريقة تجرى عملية الاستخلاص على ستة أجزاء من عينة المتمم A المتجانسة بهدف الحصول على ستة مكررات لعملية الاستخلاص ، وتم تحديد الانحراف المعياري (SD) و الانحراف المعياري النسبي (RSD%) ، حيث حددت من العلاقات التالية وأدرجت النتائج في الجدول (7) [126-127] :

- الانحراف المعياري (SD) : هو الجذر التربيعي لمجموع مربعات الانحرافات عن القيمة المتوسِّطة مقسوماً على عدد العيِّنات.

$$S.D = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n}(Y_i - \overline{Y})^2}{N-1}}$$

- الانحراف المعياري النسبي (RSD%) : هو حاصل قسمة الانحراف المعياريّ على القيمة المتوسِّطة مضروباً بالعدد 100.

$$R.S.D\% = 100 / \overline{Y}\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n}(Y_i - \overline{Y})^2}{N-1}}$$

الجدول (7) تكرارية طريقة الترميد الجاف

المكررات	1	2	3	4	5	6	المتوسط الحسابي $\overline{Y}$
التركيز مكغ/غ	25.1	26.3	28.4	22.2	26.3	29.5	26.3

الانحراف المعياري S.D = 2.6

الانحراف المعياري النسبي R.S.D% = 9.8%

2.2.5.1.2 الدقة الوسطى (Intermediate precision) :

تم تحديد الدقة الوسطى باستخلاص ثلاثة مكررات لعينة المتمم الغذائي A على مدى ستة أيام وأدرجت النتائج في الجدول (8) .

الجدول (8) نتائج تكرار الاستخلاص في ست أيام مختلفة

المكررات	اليوم الأول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع	اليوم الخامس	اليوم السادس
1	25.6	28.7	24.4	26.3	22.6	29.8
2	23.9	25.3	26.6	29.8	26.4	24.7
3	22.4	29.2	25.3	28.1	23.2	25.3

2.2 الترميد الرطب Wet Ashing [129-128]:

1.2.2 المبدأ :

يسمى أيضاً الهضم بالنظام المفتوح (Open System Digestion) . ويعتمد مبدأ الطريقة على هضم العينة باستخدام مزيج من محاليل الحموض الكيميائية وبتطبيق درجة حرارة (~130°) ، أقل من درجة الحرارة المطبقة بالترميد الجاف ، باستخدام محم كهربائي . حيث يعامل مسحوق العينة بحمض الآزوت وحمض فوق الكلورات 70% .

2.2.2 المحاليل المستخدمة :

- محلول حمض الآزوت الكثيف 65% HNO_3 .
- محلول حمض فوق كلور الماء 70% $HClO_4$.(يقي من تطاير السيلينيوم
- محلول حمض كلور الماء المركز 37% HCl .

- ماء مضاعف التقطير Double Distilled Water .

3.2.2 الأجهزة المستخدمة :

- محمّ كهربائي من نوع Memmert .
- ميزان حساس **(Sensitive balance)** من نوع Sartorius TE64 حساسية 0.1 ملغ .

4.1.2 طريقة العمل :

يوزن 1غرام من مسحوق عينة المتمم الغذائي وتوضع في بيشر ، ثم يضاف 10 مل من حمض الآزوت المركز 65% ، تمزج جيداً ويسخن إلى أن تنحسر أبخرة حمض الآزوت ، يبرد المزيج ثم يضاف 3 مل من من فوق كلور الماء 70% ويسخن المزيج إلى أن تظهر أبخرة فوق الكلورات البيضاء وتصبح العينة المهضومة عديمة اللون .

بحالة بقاء لون العينة المهضومة كما هو ، نضيف 3 مل من حمض الآزوت الكثيف وتسخن لمدة 10 دقائق ومن ثم يضاف 3مل من فوق كلور الماء ويسخن المزيج حتى اختفاء اللون ، تكرر الخطوة حتى الحصول على عينة مهضومة عديم اللون . بعد ذلك يضاف 2.5 مل من حمض كلور الماء المركز 37% وتسخن إلى أن تطرد كل أبخرة حمض الآزوت الكثيف ، ثم يضاف 20 مل من الماء المضاعف التقطير ويسخن المزيج لمدة 3 دقائق .يبرد المزيج ثم ينقل إلى بالون معاير سعة 100 مل ويكمل بالماء المضاعف التقطير إلى خط العيار .

يحضر الشاهد بنفس الطريقة السابقة وذلك باستخدام نفس الكميات من المحاليل ويخضع الشاهد للمراحل السابقة نفسها .

5.2.2 ضبط طريقة الاستخلاص :Validation of Extraction method

1.5.2.2 تحديد مردود الاستخلاص :

تم تحديد مردود الاستخلاص وذلك باستخلاص كل من عينة المتمم الغذائي A والمتمم الغذائي B وتحديد الكمية الموجودة من السيلينيوم وذلك باستخدام جهاز الطيف الضوئي بالامتصاص الذري ، وبعدها يتم إضافة سيلينيوم عياري ممدد (10 ppm) (spike) بثلاثة حجوم مختلفة وتعاد عملية الاستخلاص لكل إضافة ونحسب المردود عند كل تركيز من العلاقة التالية [126] :

$$\text{المردود (Recovery) \%} = \frac{\text{الكمية المستخلصة بعد الإضافة} - \text{الكمية المستخلصة قبل الإضافة}}{\text{الكمية}} \times 100$$

وكانت النتائج كما في الجدول (9) و(10)

الجدول (9) دراسة مردود طريقة استخلاص المتمم A

الكمية المستخلصة قبل الإضافة مكغ/غ	الكمية المضافة من السيلينيوم العياري إلى 1 غ من العينة (مكغ)	الكمية الكلية المتوقعة نظرياً في 1 غ من العينة مكغ/غ	الكمية المستخلصة بعد الإضافة مكغ/غ	المردود Recovery %
31.9	6	37.9	37.6	95%
31.9	8	39.9	39.36	93.3%
31.9	10	41.9	41.5	96%

ويكون متوسط مردود استخلاص المتمم A : 94.8%

الجدول (10) دراسة مردود طريقة استخلاص المتمم B

الكمية المستخلصة قبل الإضافة مكغ/غ	الكمية المضافة من السيلينيوم العياري إلى 1 غ من العينة (مكغ)	الكمية الكلية المتوقعة نظرياً في 1 غ من العينة مكغ/غ	الكمية المستخلصة بعد الإضافة مكغ/غ	المردود Recovery %
96.1	6	102.1	101.9	96.7%
96.1	8	104.1	103.7	95%
96.1	10	106.1	105.5	94%

ويكون متوسط مردود استخلاص المتمم B : 95.2%

2.5.2.2 تحديد دقة الطريقة :

تحدد الدقة من خلال تحديد تكرارية الطريقة والدقة الوسطى .

1.2.5.2.2 التكرارية (Repeatability) :

لتحديد تكرارية الطريقة تُجرى عملية الاستخلاص على ستة أجزاء من عينة المتمم A المتجانسة بهدف الحصول على ستة مكررات لعملية الاستخلاص مضافاً ، وتم تحديد المتوسط الحسابي ($\bar{Y}$) ، الانحراف المعياري (SD) و الانحراف المعياري النسبي (RSD%) ، حيث حددت من العلاقات التالية وأدرجت النتائج في الجدول (11) .

الجدول (11) تكرارية طريقة الترميد الرطب

المكررات	1	2	3	4	5	6	المتوسط الحسابي $\overline{Y}$
التركيز مكغ/غ	33.6	31.4	30.5	32.9	31.3	31.7	31.9

الانحراف المعياري S.D = 1.14

الانحراف المعياري النسبي R.S.D% = 3.57%

2.2.5.2.2 الدقة الوسطى (Intermediate precision) :

تم تحديد الدقة الوسطى باستخلاص ثلاثة مكررات لعينة المتمم الغذائي A على مدى ستة أيام وأدرجت النتائج في الجدول (12) .

الجدول (12) نتائج تكرار الاستخلاص في ست أيام مختلفة

المكررات	اليوم الأول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع	اليوم الخامس	اليوم السادس
1	31.6	33.4	32.8	32.2	31.9	31.6
2	33.4	32.2	31.5	33.1	32.6	31.3
3	31.3	32.7	30.9	31.4	32.3	33.5

3.2 الهضم باستخدام الأشعة الماكروية Microwave Digestion

[133-132-131-130] :

1.3.2 المبدأ :

يسمى أيضاً الهضم بالنظام المغلق (Closed System Digestion) حيث يعتمد على هضم العينة باستخدام حمض الآزوت والماء الأوكسجيني مع تطبيق درجات حرارة (مصدرها الأشعة الماكروية / طاقة كهرومغناطيسية) و ضغط وفق نظام مضبوط .

2.3.2 المحاليل المستخدمة :

- حمض الآزوت الكثيف HNO_3 65% .
- ماء أوكسيجيني H_2O_2 30% .
- ماء مضاعف التقطير Double Distilled Water .

3.3.2 الأجهزة المستخدمة :

- جهاز الهضم بالأشعة الماكروية Microwave digestion صنع شركة Anton Paar الألمانية : يستخدم لمعالجة وتهضيم العينات ، يمكن برمجته ببرنامج معالجة مناسب حسب نوع العينة .
- ميزان حساس **(**Sensitive balance**)** من نوع Sartorius TE64 حساسية 0.1 ملغ .

4.3.2 طريقة العمل :

تجهز عدة وزنات من مسحوق العينة بوزن 1غرام وتوضع في أنابيب الهضم Digestion tubes ونضيف لكل منها 6 مل من حمض الأزوت الكثيف و 2 مل من الماء الأوكسجيني وننتظر مدة 15 دقيقة ، ثم نغلق أنابيب الهضم بشكل جيد ، ونضعها في جهاز الهضم ، كما هو موضح بالشكل (11) ، وتبدأ المعالجة الحرارية وفق البرنامج التالي :

Ramp 20 min Power 700 W , Hold 15 min , Fan 1

Ramp 0 min Power 300 W , Hold 15 min , Fan 1

Ramp 0 min Power 0 W , Hold 20 min , Fan 2



الشكل (11) جهاز الهضم Microwave digestion

يفتح جهاز الميكرويف ثم يتم فتح (تنفيس) أنبوب الهضم ويترك مدة 15 دقيقة . وبعدها يتم تفريغ محتوى أنابيب الهضم في دورق عياري سعة 100 مل ويمدد بالماء المضاعف التقطير حتى خط العيار .

5.3.2 ضبط طريقة الاستخلاص Validation of Extraction method:

1.5.3.2 تحديد مردود الاستخلاص :

تم تحديد مردود الاستخلاص وذلك باستخلاص كل من عينة المتمم الغذائي A والمتمم الغذائي B وتحديد الكمية الموجودة من السيلينيوم وذلك باستخدام جهاز الطيف الضوئي بالامتصاص الذري ، وبعدها يتم إضافة (spike) سيلينيوم عياري بثلاثة تراكيز مختلفة وتعاد عملية الاستخلاص لكل إضافة ونحسب المردود عند كل تركيز من العلاقة التالية [126] :

$$\text{المردود (Recovery) \%} = \frac{\text{الكمية المستخلصة بعد الإضافة} - \text{الكمية المستخلصة قبل الإضافة}}{\text{الكمية المضافة}} \times 100$$

وكانت النتائج كما في الجدول (13) و(14)

الجدول (13) دراسة مردود طريقة استخلاص المتمم A

الكمية المستخلصة قبل الإضافة مكغ/غ	الكمية المضافة من السيلينيوم العياري إلى 1 غ من العينة (مكغ)	الكمية الكلية المتوقعة نظرياً في 1 غ من العينة مكغ/غ	الكمية المستخلصة بعد الإضافة مكغ/غ	المردود Recovery %
34.6	6	40.6	40.57	99.5%
34.6	8	42.6	42.58	99.8%
34.6	10	44.6	44.57	99.7%

ويكون متوسط مردود استخلاص المتمم A : 99.7%

الجدول (14) دراسة مردود طريقة استخلاص المتمم B

الكمية المستخلصة قبل الإضافة مكغ/غ	الكمية المضافة من السيلينيوم العياري إلى 1 غ من العينة (مكغ)	الكمية الكلية المتوقعة نظرياً في 1 غ من العينة مكغ/غ	الكمية المستخلصة بعد الإضافة مكغ/غ	المردود Recovery %
99.2	6	105.2	105.16	99.3%
99.2	8	107.2	107.16	99.5%
99.2	10	109.2	109.18	99.8%

ويكون متوسط مردود استخلاص المتمم B : 99.5%

2.5.3.2 تحديد دقة الطريقة :

تحدد الدقة من خلال تحديد تكرارية الطريقة والدقة الوسطى .

1.2.5.3.2 التكرارية (Repeatability) :

لتحديد تكرارية الطريقة تُجرى عملية الاستخلاص على ستة أجزاء من عينة المتمم A المتجانسة بهدف الحصول على ستة مكررات لعملية الاستخلاص مضافاً ، وتم تحديد المتوسط الحسابي (X) ، الانحراف المعياري (SD) و الانحراف المعياري النسبي (RSD%) ، حيث حددت من العلاقات التالية وأدرجت النتائج في الجدول (15) .

الجدول (15) تكرارية طريقة الهضم بالأشعة الماكروية

المكررات	1	2	3	4	5	6	المتوسط الحسابي $\overline{Y}$
التركيز مكغ/غ	34.4	34.7	34.5	34.6	34.3	34.5	34.5

الانحراف المعياري S.D = 0.14

الانحراف المعياري النسبي R.S.D% = 0.41%

2.2.5.3.2 الدقة الوسطى (Intermediate precision) :

تم تحديد الدقة الوسطى باستخلاص ثلاثة مكررات لعينة المتمم الغذائي A على مدى ستة أيام وأدرجت النتائج في الجدول (16) .

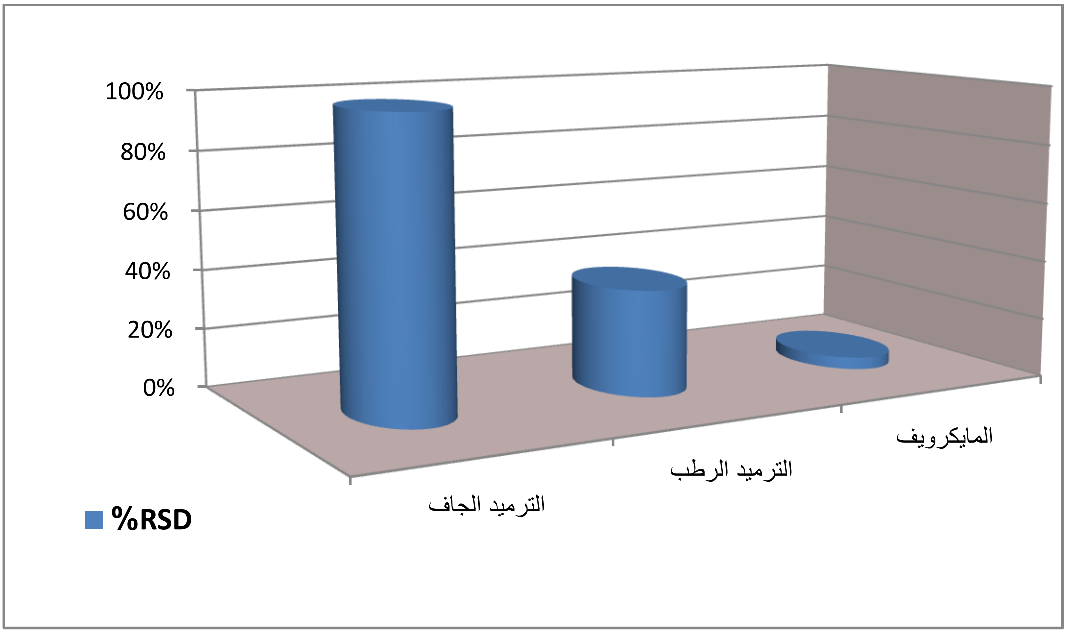
الجدول (16) نتائج تكرار الاستخلاص في ست أيام مختلفة

المكررات	اليوم الأول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع	اليوم الخامس	اليوم السادس
1	33.8	34.5	34.8	34.4	34.7	33.9
2	34.4	34.3	33.9	34.6	34.5	34.3
3	34.8	33.8	34.5	34.7	33.9	34.6

4.2 مقارنة طرائق الاستخلاص :

1.4.2 مقارنة الطرائق من حيث التكرارية :

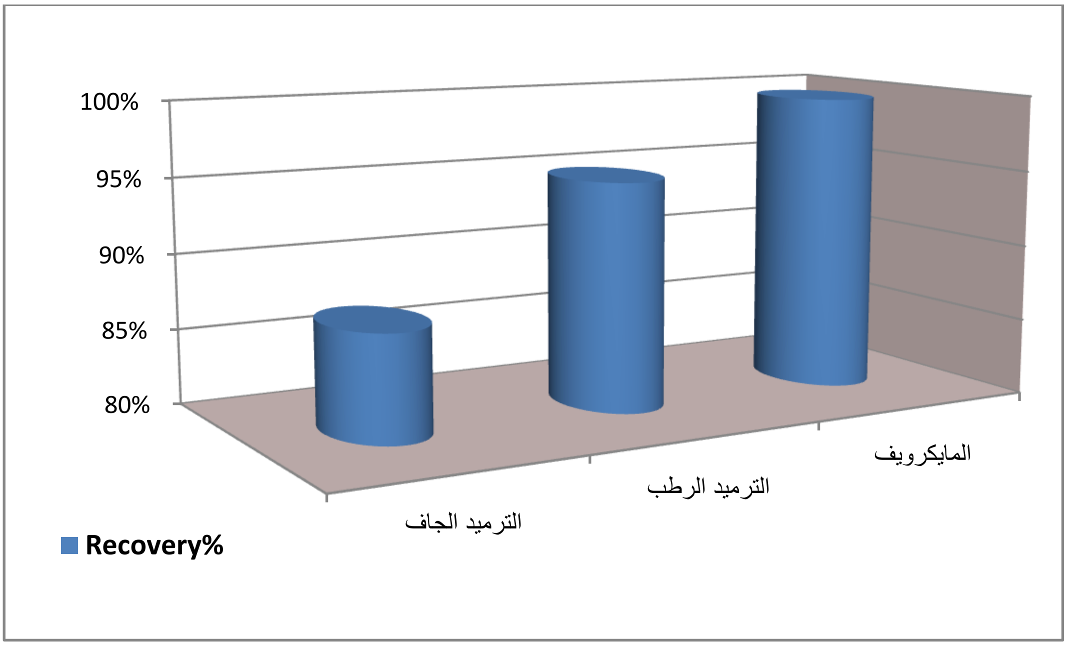
لدى دراسة تكرارية طرائق الاستخلاص السابقة ، تبين أن طريقة الهضم بالمايكروويف ذات تكرارية أعلى من طريقتي الترميد الجاف والترميد الرطب فقد بلغت قيمة الانحراف المعياري النسبي لطريقة الهضم بالمايكروويف 0.41% ، ويوضح الشكل (12) مقارنة بيانية لتكرارية طرائق الاستخلاص المستخدمة .



الشكل (12) مقارنة لتكرارية استخلاص الطرائق المستخدمة

2.4.2 مقارنة الطرائق من حيث المردود :

لدى دراسة مردود طرائق الاستخلاص السابقة ، تبين أن متوسط مردود طريقة الهضم بالمايكروويف أعلى من متوسط مردود طريقتي الترميد الجاف والترميد الرطب فقد بلغ متوسط مردود طريقة الهضم بالمايكروويف 99.6%. يوضح الشكل (13) مقارنة بيانية لمتوسط مردود طرائق الاستخلاص المستخدمة.



الشكل (13) مقارنة لمردود استخلاص الطرائق المستخدمة

5.2 اختيار طريقة الاستخلاص :

بالمقارنة بين طرائق الاستخلاص السابقة نجد أن طريقة الهضم بالمايكروويف طريقة سهلة ، سريعة ، أقل جهد ، تتميز بتوفير كميات كبيرة من المحلات اللازمة للاستخلاص وذات تكرارية أكبر ومردود أعلى بالمقارنة مع طريقتي الترميد الجاف والرطب .وبالتالي تم اختيار طريقة الهضم بالمايكروويف وذلك في استخلاص السيلينيوم من عينات المتممات الغذائية المفحوصة .

3

الطرائق التحليلية المستخدمة في مقايسة السيلينيوم

Analytical Methods Used For Selenium Determination

1.3 المقايسة باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometry :

1.1.3 المقايسة باستخدام الثيونين (Thionin) :

1.1.1.3 المبدأ (Principle) :

تعتمد هذه الطريقة على القدرة المؤكسدة للسيلينيوم . حيث يتفاعل السيلينيوم مع يود البوتاسيوم في وسط حمضي لتحرير اليود . اليود المتحرر يزيل (يبيض) bleaches اللون البنفسجي لكاشف الثيونين . فعند إضافة تراكيز متدرجة من السيلينيوم إلى حجم معين ومعلوم التركيز من محلول كاشف الثيونين سيتناقص لون الكاشف ، ويكون مقدار تناقص اللون متناسباً مع تركيز السيلينيوم .

2.1.1.3 الأجهزة والأدوات (Instruments) :

- مقياس الطيف الضوئي: UV-Vis Spectrophotometer من نوع – HTACHI model U-2400 .
- جهاز المايكرويف (Microwave Digestion) صنع شركة Anton Paar الألمانية : يستخدم لمعالجة وتهضيم العينات ، يمكن برمجته ببرنامج معالجة مناسب حسب نوع العينة .
- ميزان حساس (Sensitive balance) من نوع Sartorius .
- خلايا كوارتز (Quartz Cell) .
- دورق معياري (Volumetric flask) : سعة 100 مل، سعة 50 مل، 25 مل ، 10مل .
- وعاء إشباع Beaker ، سعة 250 مل .
- ماصات معيارية (Pipette) ، سعة 1 مل ، 2 مل ، 5 مل ، 10 مل .

3.1.1.3 الكواشف والمحاليل (Chemicals and Reagents) :

- كاشف الثيونين (Thionin) بتركيز 0.1% من إنتاج شركة Sigma Aldrich.
- محلول عياري أم Stock Solution من السيلينيوم بتركيز 1000 مكغ/مل من السيلينيوم :

  يحضر بحل 0.219 غ من سيلينيت الصوديوم Na_2SeO_3 (من إنتاج شركة Sigma Aldrich) في 30 مل من الماء المضاعف التقطير ويتم التحريك حتى تمام الانحلال ، ثم ينقل المحلول الناتج لبالون معاير سعة 100 مل ويكمل الحجم بالماء المضاعف التقطير حتى خط العيار .
- محلول (EDTA-Ethylene diamine tetra acetic acid) 5 % :

  يحضر بحل 2.5 غ من EDTA في 20 مل من الماء المضاعف التقطير ، ثم ينقل المحلول الناتج لبالون معاير سعة 50 مل ويكمل الحجم بالماء المضاعف التقطير حتى خط العيار .
- محلول يود البوتاسيوم KI 2% (2 غ من يود البوتاسيوم تحل في بالون معاير سعة 100مل ويكمل بالماء المضاعف التقطير حتى خط العيار) .
- محلول حمض كلور الماء HCl 2 مول/ لتر (16.2مل من حمض كلور الماء 37% في بالون سعة 100مل ويكمل بالماء المضاعف التقطير حتى خط العيار) .
- ماء مضاعف التقطير Double Distilled Water من إنتاج شركة Sigma Aldrich .

4.1.1.3 طريقة العمل (Procedure) :

- تحضير السلسلة العيارية :

يحضر محلول عياري ممدد من السيلينيوم بتركيز 10 مكغ/مل ، وذلك بأخذ 1 مل من المحلول العياري الأم للسيلينيوم ، توضع في بالون معاير سعة 100 مل وتمدد لخط العيار. تحضر سلسلة معيارية بتراكيز تتراوح من (0.5- 4.5) مكغ/مل وذلك بأخذ الحجوم اللازمة من المحلول الممدد للسيلينيوم ، ويوضع كل منها في بالون معاير سعة 10 مل . يضاف إلى كلّ من بالونات السلسلة 1 مل من محلول يود البوتاسيوم (KI 2%) ، و 1 مل من (HCl 2%) ، ثم يرج المزيج بلطف حتى ظهور اللون الأصفر ، الذي يدل على أكسدة اليوديد (I^-) إلى اليود (I_2) في الوسط . عندها يضاف 0.5 مل من كاشف الثيونين

(Thionin 0.1%) وتمزج البالونات جيداً لمدة دقيقتين . يكمّل محتوى البالونات بالماء المضاعف التقطير لخط العيار وتمزج جيداً .

يتم تحضير الشاهد بنفس طريقة تحضير بالونات السلسلة العيارية ولكن باستبدال محلول السيلينيوم العياري بالماء المضاعف التقطير .

تقاس الامتصاصية الضوئية للمحاليل عند طول موجة الامتصاص الأعظمي ، يؤخذ امتصاص المحلول A_1 ويطرح من امتصاص الشاهد A_0 ، فرق القيمتين (A) يقابل التركيز . تحضر العينة المقاسة بالطريقة نفسها ويحدد تركيز السيلينيوم في العينة من خلال المنحني العياري وتحديد معادلة المستقيم . يوضح الجدول رقم (17) طريقة تحضير السلسلة المعيارية .

ملاحظة : عند تحضير العينات ، في آخر مرحلة نضيف 5 مل من محلول EDTA (5%) قبل إضافة كاشف الثيونين (TN) .

الجدول رقم (17) تحضير السلسلة العيارية في مقايسة السيلينيوم لونياً

رقم المحلول	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	الشاهد	
محلول سيلينيوم ممدد 10 مكغ/مل	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	–	مل
يود البوتاسيوم 2%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	مل
حمض كلور الماء 2%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	مل
كاشف الثيونين 0.1%	0.5	0.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	مل
ماء مضاعف التقطير	كمية كافية حتى 10 مل										
التركيز المقابل مكغ/مل	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	0	مل

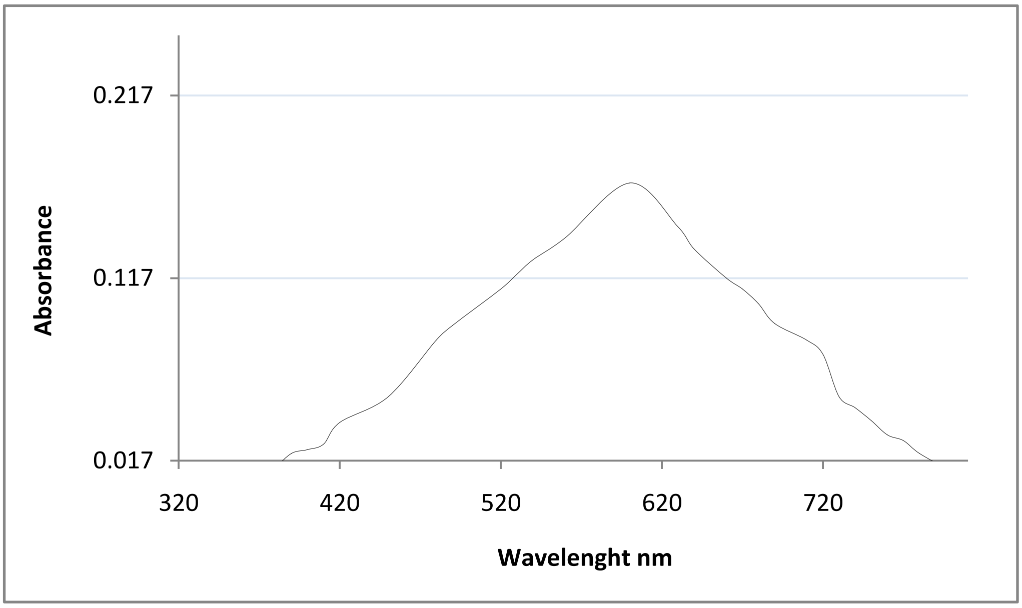
5.1.1.3 تحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي (λ_{max}) :

تم تحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي لمحلول من السيلينيوم بعد أن خضع لتفاعل الاشتقاق لإعطاء اللون بإجراء مسح طيفي ضمن المجال 380 - 800 nm حيث أخذ من أجل هذه الغاية البالون رقم 4 في السلسلة .

يبين الجدول (18) الامتصاص لهذا المحلول في الأطوال الموجية المختلفة كما يبين الشكل (14) المنحني الدال على تغيرات الامتصاص بتغير طول الموجة . يستنتج منه طول موجة الامتصاص الأعظمي .

جدول رقم (18): تحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي للسيلينيوم

الامتصاص	طول الموجة	الامتصاص	طول الموجة	الامتصاص	طول الموجة	الامتصاص	طول الموجة
0.013	380	0.078	470	0.144	570	0.117	660
0.021	390	0.083	480	0.147	580	0.111	670
0.023	400	0.091	490	0.158	590	0.103	680
0.026	410	0.091	500	0.169	600	0.092	690
0.038	420	0.095	510	0.156	610	0.084	700
0.039	430	0.111	520	0.149	620	0.083	710
0.041	440	0.119	530	0.145	630	0.075	720
0.052	450	0.127	540	0.133	640	0.052	730
0.059	460	0.139	560	0.121	650	0.046	740



الشكل (14) تغير امتصاص المحلول بتغير طول الموجة بهدف تحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي

يبين الجدول والخط البياني السابقين أن طول موجة الامتصاص الأعظمي في هذه الطريقة هو 600 نانومتر.

6.1.1.3 مصدوقية الطريقة (Method validation) :

يتم التحقق من مصدوقية أي طريقة تحليلية من خلال مجموعة من الإجراءات والدراسات المخبرية التي يجري من خلال تنفيذها التأكد من أن أداء هذه الطريقة التحليلية سيتوافق دائماً مع المتطلبات التحليلية .

فمصدوقية طريقة تحليلية يعني أن هذ ه الطريقة ملائمة للغرض المعدة من أجله وتعطي نتائج تتمتع بالدقة والمضبوطية في كل مرة ينجز فيها التحليل .

ويتم التحقق من المصدوقية للطرائق التحليلية من خلال إجراء مجموعة من المتثابتات التحليلية (Analytical Parameter) وهي [134-133] :

- المجال (Range) .
- الخطيـــة (Linearity) .
- الدقـــــــــة (Precision) .
  - التكرارية (Repeatability) .

- الدقة الوسطى (Intermediate precision) .

- المضبوطية (Accuracy) .
- النوعيـة (Selectivity) .
- الـمتــانـة (Robustness) .
- حد الكشــــــف (Limit of Detection) .
- حد القياس الكمي (Limit of Quantification) .

المجال (Range) : [135-134]

هو المدى بين الحد الأعلى والحد الأدنى (متضمناً هذين الحدين) من تركيز المادة المفحوصة والذي تكون فيه الطريقة دقيقة ومحكمة وحساسة وخطية **.**

الخطيـــة (Linearity) : [135-134]

خطية طريقة تحليلية ما هي قابليتها لإعطاء نتائج قياس متناسبة طرداً مع تركيز المادة المحللة في العينة ضمن المجال المعطى لها سواءً بشكل مباشر أو بعد إجراء تحويلات رياضية محددة **.**

يوصي المؤتمر الدولي للمواءمة (ICH) لتعيين الخطية استخدام (5) محاليل عيارية كحد أدنى تتراوح بين (80 – 120%) من التركيز المتوقع للمادة المراد تحليلها .

يجرى تقويم الخطية بالكشف البصري للرسم البياني التابع لتغير الإشارة بتغير التركيز.

عند وجود علاقة خطية واضحة للطريقة التحليلية يجب إجراء تقويم للخطية بطريقة إحصائية مناسبة ، بحساب انحدار الخط البياني regress line بطريقة المربعات الصغرى least square الذي يمثل العلاقة بين التركيز والاستجابة .

ثم يجري استخلاص المعلومات للتقييم الرياضي لدرجة الارتباط ، من خلال حساب:

- معامل الارتباط r (correlation coefficient)

$$\mathbf{r} = \frac{\sum_{i=1}^{n} (Xi - \bar{X})\,(Yi - \bar{Y})}{n\,\sigma x\,\sigma y}$$

- إحداثيات محور العينات y-intercept
- الميل slope

℘ **الدقــــــــة (Precision) :**[135-134]

تعبر عن مدى توافق (closeness of agreement) نتائج الاختبارات فيما بينها عند إجراء عدد من المقايسات لمكررات العينة نفسها .

يعبر عن الدقة بالمفاهيم الرياضية والإحصائية :

إما بالانحراف المعياري ("Standard Deviation "SD)

أو الانحراف المعياري النسبي ("Relative Standard Deviation "RSD)

وقد درست دقة الطريقة على مستويين من خلال دراسة :

- **التكرارية (Repeatability) :**

وهي تعبر عن قابلية تكرار النتائج ضمن المختبر نفسه بعد فترة زمنية قصيرة من المحلل نفسه وبالأجهزة نفسها .

- **الدقة الوسطى (Intermediate precision) :**

وهي تعبر عن مدى اختلاف النتائج لدى تطبيق الطريقة نفسها في المختبر نفسه في أيام مختلفة .

℘ **المضبوطيــــــة (Accuracy)** [135-134] **:**

تعبر عن مدى اقتراب نتائج تحليل ما من القيمة الحقيقية ، ويصطلح عليها أحيانا بالصحة **(trueness) .** ولتحديدها يتم إجراء مقايسات لثلاثة مستويات من التراكيز المحضرة من محلول المادة العياري بواقع ثلاث مكررات لكل منها ويتم تحديد معامل الانزياح النسبي لكل مستوى من مستويات التراكيز الثلاثة والذي يعطى بالعلاقة التالية :

$$\boldsymbol{RB = \left|\frac{X-Y}{Y}\right| \times 100}$$

حيث X : المتوسط الحسابي للتراكيز العملية ، **Y** : التركيز النظري المحضّر

℘ **النوعيـة (Selectivity) :** [135-134]

هي قابلية الطريقة التحليلية لمقايسة المادة المراد تحليلها بدقة ومضبوطية مناسبتين بالرغم من وجود مركبات ومواد يمكن أن تؤثر في المقايسة ، أي هي قدرة الطريقة على أن تعطي استجابة خاصة بالمادة المختبرة بمفردها فقط .

℘ **المتانة (Robustness) :** [135-134]

إن متانة طريقة تحليلية هي مقياس لمقدرة الطريقة على بقائها غير متأثرة بالمتغيرات الصغيرة الموضوعة بشكل معتمد في معايير هذه الطريقة ، وبيان ما يثبت أن الطريقة التحليلة مصدوقة النتائج خلال الاستخدام العادي الروتيني ، مثل تغيير طول موجة الامتصاص أو التدفق أو درجة حرارة العمود أو حجم الحقن.

℘ **حد القياس الكمي (Limit of Quantification) :** [135-134]

يعرف حد القياس الكمي لطريقة تحليلية ما بأنه أقل كمية من المادة المراد تحليلها في العينة والتي يمكن قياسها بدقة ومضبوطية مناسبتين ، وقد تم تحديد حد القياس الكمي انطلاقا من الخط البياني الممثل لتغيرات الامتصاص بتغير التركيز وذلك من العلاقة (69) :

$$LOQ = 10\, Sd(b)/a$$

حيث :

$Sd(b)$: هي الانحراف المعياري لنقطة تقاطع الخط المستقيم مع محور العينات.

a : هي ميل الخط المستقيم

℘ **حد الكشـــــــف (Limit of Detection) :** [135-134]

يُعرّف حد الكشف لطريقة تحليلية ما بأنه أقل كمية من المادة المحللة في العينة والتي يمكن كشفها وإنما ليس بالضرورة تعيينها كمياً بشكل دقيق . وقد حدد من العلاقة(69):

$$LOD = 3.3\, Sd(b)/a$$

1.6.1.1.3 الخطيـــة (Linearity) :

حضّرت سلسلة عيارية من محلول السيلينيوم بالتراكيز التالية (0.5 - 1 - 1.5 – 2 – 2.5 – 3 – 3.5 – 4 – 4.5) مكغ/مل وتمت قراءة إمتصاصية كل تركيز من التراكيز الخمسة السابقة ثلاث مرات وحساب وسطي الإمتصاصيات عند كل تركيز كما يظهر الجدول (19) ، ثم رسم الخط البياني لهذا الامتصاص وتم حساب معامل الإرتباط . حيث وجد بأنه 0.9926 وهذا مايشير إلى وجود خطية جيدة بين تركيز السيلينيوم والإمتصاص ضمن القيم المذكورة أعلاه . وتم تحديد معادلة الارتداد الخطي Liner Regression Equation كما هو موضح بالشكل (15) .

جدول رقم (19) امتصاصية أنابيب السلسلة المعيارية لمحلول السيلينيوم

التَّركيز ppm	الامتصاصيَّة 1	الامتصاصيَّة 2	الامتصاصيَّة 3	متوسِّط الامتصاصيَّة
0.5	0.046	0.045	0.046	0.045
1	0.078	0.078	0.077	0.077
1.5	0.118	0.117	0.119	0.118
2	0.169	0.169	0.169	0.169
2.5	0.234	0.235	0.234	0.234

0.278	0.278	0.279	0.279	**3**
0.322	0.323	0.323	0.322	**3.5**
0.363	0.364	0.363	0.364	**4**
0.381	0.382	0.381	0.381	**4.5**

جرى حساب قيمة مربع معامل الارتباط R^2 (correlation coefficient) للتحقق من وجود علاقة ارتباط بين التراكيز وقيم الامتصاص ($R^2_{=0.9902}$) وهي قريبة من الواحد وبالتالي هناك علاقة ارتباط بين التركيز وقيم الامتصاص ولتحديد نوع الارتباط نلجأ لتحديد قيمة ($F_{Significanc}$) من خلال تحليل الانحدار (Regression Statistics) وتحليل التباين ANOVA كما يظهر في الجدول (20) .

الجدول (20) تحليل التباين ANOVA

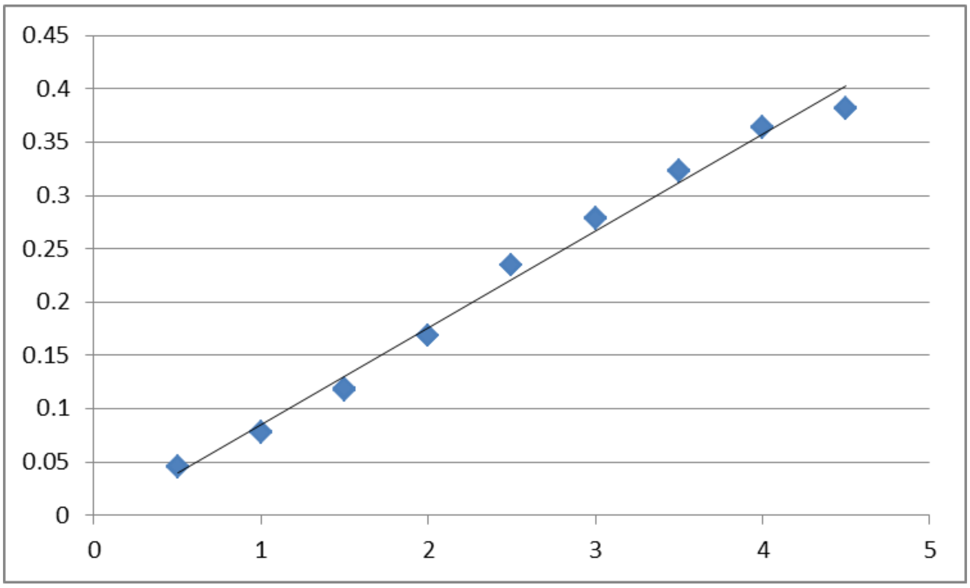
ANOVA					
	Df	*SS*	*MS*	*F*	*Significance F*
Regression	1	0.369829339	0.369829339	2516.991	1.29E-26
Residual	25	0.003673328	0.000146933		
Total	26	0.373502667			

نجد من تحليل الانحدار السابق أن قيمة Significance F $=1.29 \times 10^{-26}$ أي أن هذه القيمة أصغر من مستوى الدلالة (0.05) وبالتالي نوع الارتباط بين قيم الامتصاص والتراكيز خطي ومن الجدول (21) يمكن كتابة معادلة الخط المستقيم على الشكل التالي:

(Y=0.091X-0.0054)   ويظهر الشكل (15) معادلة الارتداد الخطي للطريقة المدروسة .

الجدول (21) تحديد معادلة الخط المستقيم

	Coefficients	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*	*Upper 95%*
Intercept	-0.0054	0.0051	-1.0651	0.296883	-0.01589	0.005054
X Variable 1	0.091	0.001806981	50.1691	1.29E-26	0.086934	0.094377



الشكل (15): معادلة الارتداد الخطي للطريقة المدروسة

2.6.1.1.3 الدقة (Precision) :

تعبر الدقة عن مدى توافق نتائج الاختبارات فيما بينها عند إجراء عدد من المقايسات لمكررات العينة نفسها ، وقد درست دقة الطريقة على مستويين من خلال دراسة : التكرارية ، والدقة الوسطى .

1.2.6.1.1.3 التكرارية (Repeatability) :

تعبر التكرارية عن الدقة ضمن شروط العمل نفسها خلال فترة زمنية قصيرة ، وقد تم تحديد التكرارية على كامل مجال الدراسة للتراكيز التسعة السابقة بواقع ثلاث مكررات لكل منها ويظهر الجدول (22) نتائج الاختبارات.

جدول رقم (22) نتائج المكررات لتحديد التكرارية

المكررات	التركيز النظري للسيلينيوم مكغ/مل	التركيز العملي للسيلينيوم مكغ/مل	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
1	0.5	0.510	0.503666667	0.007767453
2		0.495		
3		0.506		
1	1	0.981	0.994666667	0.050895317
2		0.952		
3		1.051		
1	1.5	1.532	1.483	0.042930176
2		1.465		
3		1.452		
1	2	2.08	1.97	0.098488578
2		1.94		
3		1.89		

0.250593296	2.474	2.501	**2.5**	**1**
		2.710		**2**
		2.211		**3**
0.098642452	2.990666667	3.101	**3**	**1**
		2.960		**2**
		2.911		**3**
0.189061718	3.487666667	3.27	**3.5**	**1**
		3.611		**2**
		3.582		**3**
0.079563392	4.020666667	4.111	**4**	**1**
		3.990		**2**
		3.961		**3**
0.161202771	4.376666667	4.551	**4.5**	**1**
		4.233		**2**
		4.346		**3**

جرى تطبيق اختبار تجانس التباين (Cochran) [136] والذي يعطى بالعلاقة :

$$C = \frac{VAR_{MAX}}{SUM(var)}$$

VAR_{Max}: أعلى مربع اللانحراف المعياري (Standard deviation).

Sum (var): مجموع مربعات الانحرافات المعيارية.

فكانت النتيجة (C=0.3) وبالمقارنة مع القيمة الحدية 0.478 نجد أن القيمة المحسوبة أقل من القيمة الحدية أي هناك تجانس بالتباين عبر مجال عمل الطريقة وبالتالي يعبر عن التكرارية بالانحراف المعياري 1.5 % والطريقة تتمتع بدقة جيدة .

2.2.6.1.1.3 الدقة الوسطى (Intermediate precision) :

تعبر الدقة الوسطى عن دقة الطريقة عند اختلاف أ حد شروط التحليل ، ولتحديدها تم تحضير محلول السيلينيوم بتركيز 4 مكغ/مل بواقع ثلاثة مكررات وعلى مدى ستة أيام ويظهر الجدول (23) نتائج التحليل للمكررات المختلفة .

الجدول (23) نتائج المكررات لتحديد الدقة الوسطى

المكررات	اليوم الأول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع	اليوم الخامس	اليوم السادس
1	4.092	3.951	3.963	4.097	4.039	4.058
2	3.981	3.967	4.078	3.991	3.978	3.992
3	4.098	4.067	4.067	3.993	4.073	4.029

وللتأكد من عدم وجود فروق جوهرية بين النتائج جرى تحليل التباين لها ، ويظهر الجدول (24) النتائج على الشكل التالي :

الجدول (24) نتائج اختبار تحليل التباين

Days	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
Day 1	3	12.079	4.026333	0.001094
Day 2	3	12.09	4.03	0.002317
Day 3	3	12.081	4.027	0.003676
Day 4	3	12.108	4.036	0.004027
Day 5	3	11.985	3.995	0.003952
Day 6	3	12.171	4.057	0.004341

ANOVA					
Source of Variation	*SS*	*Df*	*MS*	*F*	F_{crit}
Between Groups	0.006	5	0.0012	0.37098	3.105875
Within Groups	0.038815	12	0.003235		
Total	0.044814	17			

يلاحظ أن قيمة F المحسوبة أقل من قيمة F_{crit} أي أنه لا يوجد فارق جوهري بين النتائج واختلاف اليوم لم يؤد إلى اختلاف النتائج ، ويكون RSD= 1.62 %.

3.6.1.1.3 المضبوطية (Accuracy) :

تمّ تحضير تسعة محاليل من السلسلة المعيارية بالتراكيز التالية (4-2.5-1) مكغ/مل ثلاثة محاليل لكل تركيز وذلك بأخذ الحجوم (4-2.5-1) مل من المحلول الممدد للسيلينيوم ذي التركيز 10 مكغ/مل ، ويوضع كل منها في بالون معاير سعة 10 مل. يضاف إلى كلّ من بالونات السلسلة 1مل من محلول يود البوتاسيوم (KI 2%) ، و 1مل من (HCl 2%) ، ثم يرج المزيج بلطف حتى ظهور اللون الأصفر ، الذي يدل على أكسدة اليوديد (I^-) إلى اليود (I_2) في الوسط . عندها يضاف 0.5 مل من كاشف الثيونين (0.1%) وتمزج البالونات جيداً لمدة دقيقتين . يكمّل محتوى البالونات بالماء المضاعف التقطير لخط العيار وتمزج جيداً. تقاس الامتصاصية الضوئية لكل محلول ثلاث مرات عند طول موجة 598.5 نانومتر ، ثم تحسب القيمة المتوسطة .

حسب التركيز العملي للسيلينيوم في كل مرة وذلك بتعويض قيم الامتصاصية في معادلة المستقيم التي تمَّ الحصول عليها من منحني السّلسلة المعياريّة. سجلت النّتائج في الجدول (25).

وتم تحديد معامل الانزياح النسبي (Relative Bias) لكل مستوى من مستويات التركيز السابقة والذي يعطى بالعلاقة التالية :

$$\boldsymbol{RB = \left|\frac{X-Y}{Y}\right| \times 100}$$

حيث X : المتوسط الحسابي للتراكيز العملية ، **Y** : التركيز النظري المحضّر

جدول (25) متوسط الامتصاصية والتركيز العملي لكل من المحاليل المختلفة

المكررات	التَّركيز النَّظري للمحلول ppm	الامتصاصية 1	الامتصاصية 2	الامتصاصية 3	متوسط الامتصاصية	التركيز العملي ppm	متوسط التركيز العملي ppm	الانزياح النسبي %
1	1	0.081	0.082	0.083	0.082	0.953	0.964	3.6%
2		0.080	0.079	0.081	0.080	0.931		
3		0.088	0.087	0.088	0.087	1.008		
1	2.5	0.236	0.235	0.234	0.236	2.653	2.582	3.28%
2		0.251	0.252	0.251	0.252	2.831		
3		0.201	0.200	0.201	0.200	2.264		
1	4	0.386	0.387	0.387	0.387	4.297	4.197	4.93%
2		0.372	0.374	0.373	0.373	4.164		
3		0.370	0.371	0.369	0.370	4.131		

يلاحظ أن الانزياح النسبي لمستويات التراكيز الثلاثة أقل من 5% وبالتالي الطريقة تتمتع بمضبوطية جيدة .

4.6.1.1.3 المتانة (Robustness) :

سيتم التحقق من متانة هذه الطريقة بتغيير طول موجة الامتصاص ، حيث تم قياس محلول العياري (ذو التركيز 4مكغ/مل) ثلاث مرات متتالية عند ثلاث أطوال أمواج مختلفة وحساب متوسط القياسات الثلاثة (n=3) ، فلم يلاحظ اختلاف هام في النتائج نتيجة تغيير طول الموجة مما يدل على متانة الطريقة التحليلية ، الجدول (26) يوضح نتائج تحديد متانة الطريقة.

جدول رقم (26) متانة الطريقة

متانة الطريقة بتغيير ثلاثة قيم مختلفة لطول موجة UV (λ_{max} = 600 ± 4 nm)		
Absorbance Mean±S.D		
Wavelenght (nm)	**Standard (4μg/ml)**	**Selenium content (%)**
596	0.359±0.001	98.6%
600	0.363±0.001	99.8%
604	0.361±0.001	99.2%

5.6.1.1.3 حد القياس الكمي (Limit of quantitation) :

تم تحديد حد القياس الكمي انطلاقاً من الخط البياني الممثل لتغيرات الامتصاص بتغير التركيز حيث يتم تحديده انطلاقاً من العلاقة :

$$\boldsymbol{LOQ = 10\,Sd(b)/a}$$

حيث :

$Sd(b)$: هي الانحراف المعياري لنقطة تقاطع الخط المستقيم مع محور العينات

a : هي ميل الخط المستقيم

ومنه نجد أن حد القياس الكمي يعادل 0.49 مكغ/مل .

6.6.1.1.3 حدّ الكشف (Limit ofdetection) :

تم تحديد حد الكشف انطلاقاً من العلاقة :

$$LOD = 3.3\,Sd(b)/a$$

ومنه نجد أنّ حدّ الكشف يعادل 0.16 مكغ/مل

2.1.3 المقايسة باستخدام 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد (3,3Diaminobenzidine Hydrochloride) :

1.2.1.3 المبدأ (Principle) :

تعتمد هذه الطريقة على تشكيل معقد ثابت أصفر اللون هو 4,3 ثنائي أمينو فينيل بيازسيلينول 3.4 Diamino Phenyl Piazselenol ناتج من تفاعل السيلينيوم الرباعي Se^{+4} مع 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد ، ثم يتم استخلاص المعقد بواسطة التولوين وتحسب شدة الامتصاص الضوئي لهذا المعقد عند طول موجة 420 نم ، حيث تتناسب شدة الامتصاص المقاسة مع تركيز السيلينيوم في المحلول .

2.2.1.3 الأجهزة والأدوات (Instruments) :

- مقياس الطيف الضوئي: UV-Vis Spectrophotometer من نوع - HTACHI model U-2400 **.**
- مقياس درجة الحموضة الـ pH .
- ميزان حساس **(**Sensitive balance**)** من نوع Sartorius TE64 حساسية 0.1 ملغ .
- خلايا كوارتز (Quartz Cel**l**) **.**
- بالونات معيارية (Volumetric flask) : سعة 100 مل، 50 مل، 25 مل و 10مل .
- ممصات معيارية (Volumetric Pipette) : سعة 1 مل، 2 مل، 5 مل و 10 مل.

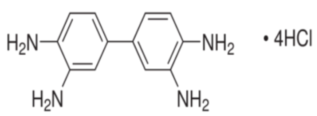
مع ملاحظة أن جميع الأدوات الزجاجية المستخدمة في كل المراحل كانت توضع خلال فترة الليل في المزيج السلفوكرومي (ثاني كرومات البوتاسيوم $K_2Cr_2O_7$ + حمض الكبريت ، ثم تشطف بالماء المضاعف التقطير .

3.2.1.3 المواد والمحاليل (Chemicals and Solution) :

1.3.2.1.3 المواد المستخدمة (Chemicals) :

- 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين رباعي هيدروكلورايد

$(NH_2)_2C_6H_3C_6H_3(NH_2)_2 \cdot 4HCl$ من إنتاج شركة Sigma- Aldrich



- عياري من السيلينيوم Standard Solution 1000 µg/ml (إنتاج شركة Merck) .
- ماء مضاعف التقطير Double Distilled Water من إنتاج شركة Sigma Aldrich .
- التولوين Toluen (إنتاج شركة Merck) .
- الكلوروفورم Chloroform (إنتاج شركة Merck) .

- البنزن Benzene (إنتاج شركة Merck) .
- أسيتون Aceton (إنتاج شركة Merck) .
- رابع كلور الفحم (CCl_4) Carbon tetrachloride (إنتاج شركة Sigma Aldrich).
- محلول النشار المركز (Panreac PRS) .
- كبريتات الصوديوم اللامائية Na_2SO_4 (إنتاج شركة Sigma Aldrich) .
- ايتتيلين دي أمين تترا اسيتيك اسيد (EDTA) Ethylene diamine tetra acetic acid .
- ثاني كرومات البوتاسيوم $K_2Cr_2O_7$ (إنتاج شركة Sigma Aldrich) .

* كافة المحلات المستخدمة هي من درجة النقاوة التحليلية Analytical grade .

2.3.2.1.3 تحضير المحاليل (Solutions Preparation) :

- محلول 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين رباعي هيدروكلورايد :

يحضر بحل 0.25 غ منه في 50 مل أسيتون ، يضاف ويحفظ في عبوة عاتمة اللون (يجب أن يكون المحلول محضرا حديثاَ) .

- محلول (EDTA-Ethylene diamine tetra acetic acid) 5 % :

يحضر بحل 2.5 غ من EDTA في 20 مل من الماء المضاعف التقطير ، ثم ينقل المحلول الناتج لبالون معاير سعة 50 مل ويكمل الحجم بالماء المضاعف التقطير حتى خط العيار .

- المزيج السلفوكرومي (H_2SO_4 - $K_2Cr_2O_7$) :

يحضر بحل 6غ من ثنائي كرومات البوتاسيوم $K_2Cr_2O_7$ في 50 مل من الماء المضاعف التقطير ويتم التحريك حتى تمام الانحلال ثم ينقل لوعاء إشباع سعة 250 مل ، بعد ذلك يضاف 100 مل من حمض الكبريت المركز 98% H_2SO_4 ثم يكمَل بالماء المضاعف التقطير حتى خط العيار .

4.2.1.3 طريقة العمل (Procedure) :

- تحضير السلسلة العيارية :

تم تحضير محلول عياري ممدد من السيلينيوم بتركيز 10 مكغ/مل ، وذلك بأخذ 1 مل من المحلول العياري الأم للسيلينيوم ، توضع في بالون معاير سعة 100 مل وتمدد بالماء المضاعف التقطير لخط العيار. تضبط حموضة المحلول الناتج بواسطة حمض الكبريت المركز لتصبح pH = 0.3± 1.5. ثم يضاف 10 مل من محلول EDTA 5% ويمزج المحلول جيداً .

ثم يحضر سلسلة معيارية بتراكيز تتراوح من (0.1 - 0.7) مكغ/مل وذلك بأخذ الحجوم اللازمة من المحلول الممدد للسيلينيوم ، ويوضع كل منها في بالون معاير سعة 10 مل.

يضاف إلى كلّ من بالونات السلسلة 0.5 مل من محلول كاشف 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد (DABH) ويسخن المزيج لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 70ºC ، ثم تضبط حموضة الوسط بواسطة النشادر المركز لتصبح pH= 1 ± 8.

بعد ذلك يتم استخلاص المعقد الملون في حبابة الإبانة بواسطة 10 مل من التولوين ، ثم تمرر طبقة التولوين الحاوية على المعقد الملون على كبريتات الصوديوم اللامائية للتجفيف.

تمّ تحضير الشاهد بنفس طريقة تحضير بالونات السلسلة العيارية ولكن باستبدال محلول السيلينيوم العياري بالماء المضاعف التقطير .

تقاس الامتصاصية الضوئية للمحاليل عند طول موجة الامتصاص الأعظمي.

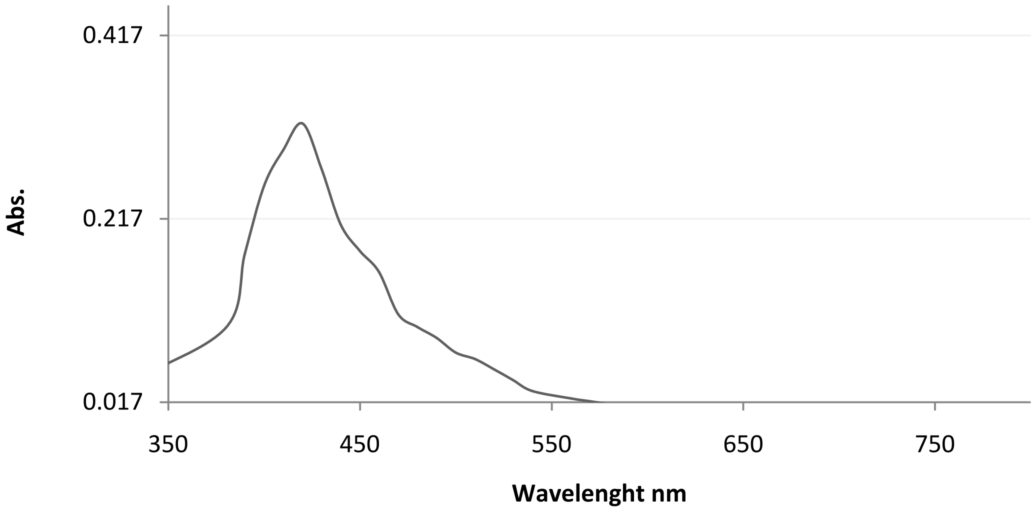
<u>**ملاحظة :**</u> عند تحضير العينات ، في آخر مرحلة نضيف 5 مل من محلول EDTA (5%) قبل إضافة محلول 3,3 DABH .

5.2.1.3 تحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي (λ_{max}) :

تم تحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي لمحلول من السيلينيوم طور فيه تشكيل المعقد بإجراء مسح طيفي ضمن المجال 380 - 600 nm . أخذ من أجل هذه الغاية البالون ذو التركيز 0.4 مكغ/مل. يبين الجدول (27) الامتصاص لهذا المحلول في الأطوال الموجية المختلفة كما يبين الشكل (16) المنحني الدال على تغيرات الامتصاص بتغير طول الموجة . يستنتج منه طول موجة الامتصاص الأعظمي .

الجدول رقم (27): تحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي للسيلينيوم

طول الموجة	الامتصاص	طول الموجة	الامتصاص
490	0.087	380	0.098
500	0.071	390	0.179
510	0.064	400	0.253
520	0.053	410	0.292
530	0.041	420	0.321
540	0.029	430	0.271
560	0.021	440	0.211
570	0.018	450	0.182
580	0.015	460	0.159
590	0.012	470	0.113
600	0.011	480	0.099



الشكل (16) تغير امتصاص المحلول بتغير طول الموجة بهدف تحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي

من الجدول (25) والشكل (16) نستنتج أن طول موجة الامتصاص الأعظمي

λ_{max} = 420 نانومتر .

6.2.1.3 مصدوقية الطريقة (Method validation) :

1.6.2.1.3 تحديد الخطية (Linearity) :

حضّرت سلسلة عيارية من محلول السيلينيوم بالتراكيز التالية (0.1- 0.2 -0.3- 0.4- 0.5- 0.6 - 0.7) مكغ/مل وعوملت حسب الطريقة الواردة في الفقرة (4.2.1.9) وتمت قراءة إمتصاصية كل تركيز من التراكيز السابقة ثلاث مرات وحساب وسطي الإمتصاصيات عند كل تركيز كما يظهر الجدول (28) ثم رسم الخط البياني لهذا الامتصاص وتم حساب قيمة مربع معامل الإرتباط R^2 (correlation coefficient) للتحقق من وجود علاقة ارتباط بين التراكيز وقيم الامتصاص . وتم تحديد معادلة الارتداد الخطي(Liner Regression Equation) كما هو موضح بالشكل (17) .

الجدول رقم (28) امتصاصية أنابيب السّلسلة المعياريّة لمحلول السيلينيوم

التَّركيز ppm	الامتصاصيَّة 1	الامتصاصيَّة 2	الامتصاصيَّة 3	متوسِّط الامتصاصيَّة
0.1	0.089	0.090	0.089	0.089
0.2	0.165	0.164	0.163	0.164
0.3	0.243	0.241	0.243	0.242
0.4	0.321	0.322	0.322	0.321
0.5	0.407	0.405	0.404	0.405
0.6	0.468	0.468	0.468	0.468
0.7	0.554	0.552	0.553	0.553

جرى حساب قيمة مربع معامل الارتباط R^2 (correlation coefficient) للتحقق من وجود علاقة ارتباط بين التراكيز وقيم الامتصاص ($R^2= 0.999$) وهي قريبة من الواحد وبالتالي هناك علاقة ارتباط بين التركيز وقيم الامتصاص ولتحديد نوع الارتباط نلجأ لتحديد قيمة ($F_{Significanc}$) من خلال تحليل الانحدار (Regression Statistics) من خلال تحليل الانحدار (Regression Statistics) وتحليل التباين ANOVA كما يظهر في الجدول (29) .

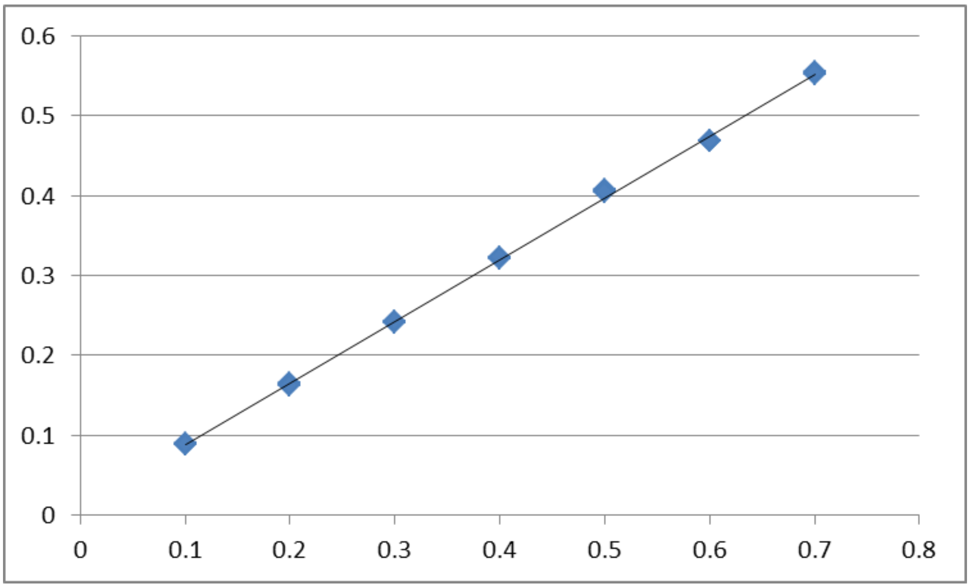
الجدول (29) تحليل التباين ANOVA

ANOVA					
	Df	***SS***	***MS***	***F***	***Significance F***
Regression	1	0.500812	0.500812	26926.82	2.07E-31
Residual	19	0.000353	1.86E-05		
Total	20	0.501165			

نجد من تحليل الانحدار السابق أن قيمة $\text{Significance F} = 2.07 \times 10^{-31}$ أي أن هذه القيمة أصغر من مستوى الدلالة (0.05) وبالتالي نوع الارتباط بين قيم الامتصاص والتراكيز خطي ومن الجدول (30) يمكن كتابة معادلة الخط المستقيم على الشكل التالي ($Y=0.77X+0.012$) ويظهر الشكل (17) معادلة الارتداد الخطي للطريقة المدروسة.

الجدول (30) تحديد معادلة الخط المستقيم

	Coefficients	***Standard Error***	***t Stat***	***P-value***	***Lower 95%***	***Upper 95%***
Intercept	0.012	0.002104	5.544044	2.39E-05	0.007262	0.016071
X Variable 1	0.77	0.004705	164.0939	2.07E-31	0.762294	0.781992



الشكل (17): معادلة الارتداد الخطي للطريقة المدروسة

2.6.2.1.3 الدقة (Precision):

درست دقة الطريقة على مستويين من خلال دراسة: التكرارية ، والدقة الوسطى .

1.2.6.2.1.3 التكرارية (Repeatability) :

تم تحديد التكرارية على كامل مجال الدراسة للتراكيز السبعة السابقة بواقع ثلاث مكررات لكل منها ويظهر الجدول (31) نتائج الاختبارات.

الجدول رقم (31) نتائج الاختبارات لتحديد التكرارية

المكررات	التركيز النظري للسيلينيوم مكغ/مل	التركيز العملي للسيلينيوم مكغ/مل	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
1	0.1	0.106	0.102666667	0.004163332
2		0.098		
3		0.104		

0.004932883	0.199333333	0.196	0.2	1
		0.205		2
		0.197		3
0.004358899	0.301	0.303	0.3	1
		0.296		2
		0.304		3
0.004618802	0.399666667	0.397	0.4	1
		0.405		2
		0.397		3
0.004582576	0.498	0.503	0.5	1
		0.494		2
		0.497		3
0.004932883	0.601666667	0.604	0.6	1
		0.596		2
		0.605		3
0.004725816	0.697666667	0.694	0.7	1
		0.703		2
		0.696		3

جرى تطبيق اختبار تجانس التباين (Cochran) والذي يعطى بالعلاقة :

$$C = \frac{VAR_{MAX}}{SUM(var)}$$

VAR_{Max}: أعلى مربع اللانحراف المعياري (Standard deviation).

Sum (var): مجموع مربعات الانحرافات المعيارية.

فكانت النتيجة (C=0.162) وبالمقارنة مع القيمة الحدية 0.561 نجد أن القيمة المحسوبة أقل من القيمة الحدية أي هناك تجانس بالتباين عبر مجال عمل الطريقة وبالتالي يعبر عن التكرارية بالانحراف المعياري 0.278 % والطريقة تتمتع بتكرارية جيدة .

2.2.6.2.1.3 الدقة الوسطى (Intermediate precision) :

لتحديدها تم تحضير محلول السيلينيوم بتركيز 0.5 مكغ/مل بواقع ثلاثة مكررات وعلى مدى ستة أيام ويظهر الجدول (32) نتائج التحليل للمكررات المختلفة.

الجدول (32) نتائج المكررات لتحديد الدقة الوسطى

المكررات	اليوم الأول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع	اليوم الخامس	اليوم السادس
1	0.509	0.495	0.491	0.508	0.493	0.492
2	0.493	0.492	0.506	0.494	0.510	0.505
3	0. 504	0.507	0.510	0.492	0.491	0.511

وللتأكد من عدم وجود فروق جوهرية بين النتائج جرى تحليل التباين لها ، ويظهر الجدول (33) النتائج على الشكل التالي :

الجدول (33) نتائج اختبار تحليل التباين

Days	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
Day 1	3	1.508	0.502667	0.000094
Day 2	3	1.494	0.498000	0.000109
Day 3	3	1.494	0.498000	0.000076
Day 4	3	1.507	0.502333	0.000100
Day 5	3	1.494	0.498000	0.000063
Day 6	3	1.506	0.502000	0.000067

ANOVA					
Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	F_{crit}
Between Groups	0.00009	5.00	0.000017	0.96	3.11
Within Groups	0.00102	12.00	0.000085		
Total	0.00110	17.00			

يلاحظ أن قيمة F المحسوبة أقل من قيمة F_{crit} أي أنه لا يوجد فارق جوهري بين النتائج واختلاف اليوم لم يؤد إلى اختلاف النتائج، ويكون RSD= 1.41 %.

3.6.2.1.3 المضبوطية (Accuracy) :

حضرت تسعة محاليل من السلسلة المعيارية بالتراكيز التالية (0.2-0.4-0.6) مكغ/مل ثلاثة محاليل لكل تركيز وذلك بأخذ الحجوم اللازمة من المحلول الممدد للسيلينيوم 10مكغ/مل ، ويوضع كل منها في بالون معاير سعة 10 مل .

يضاف إلى كلّ من بالونات السلسلة 0.5 مل من محلول 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد (DABH) ويسخن المزيج (درجة حرارة الحمام المائي 70ºC) لمدة 20 دقيقة ، ثم يتم ضبط حموضة الوسط بواسطة النشادر المركز لتصبح pH= 8 ±1.

بعد ذلك يتم استخلاص المعقد الملون في حبابة الإبانة بواسطة 10 مل من التولوين ، ثم تمرر طبقة التولوين الحاوية على المعقد الملون على كبريتات الصوديوم اللامائية للتجفيف .

حُسِبَ التَّركيز العملي للسيلينيوم في كلّ مرَّة وذلك بتعويض قيم الامتصاصيَّة في معادلة المستقيم التي تمَّ الحصول عليها من منحني السّلسلة المعياريّة. سُجِّلت النَّتائج في الجدول رقم (34) .

وتم تحديد معامل الانزياح النسبي (Relative Bias) لكل مستوى من مستويات التركيز السابقة والذي يعطى بالعلاقة التالية :

$$RB = \left|\frac{X-Y}{Y}\right| \times 100$$

حيث X : المتوسط الحسابي للتراكيز العملية ، Y : التركيز النظري المحضّر

الجدول (34) متوسط الامتصاصية والتركيز العملي لكل من المحاليل المختلفة

المكررات	التَّركيز النَّظري للمحلول ppm	الامتصاصيَّة 1	الامتصاصيَّة 2	الامتصاصيَّة 3	متوسط الامتصاصية	التركيز العملي ppm	متوسط التركيز العملي ppm	الانزياح النسبي %
1	0.2	0.168	0.169	0.169	0.169	0.205	0.204	2%
2		0.162	0.163	0.164	0.163	0.196		
3		0.173	0.174	0.175	0.174	0.211		
1	0.4	0.313	0.313	0.314	0.313	0.391	0.395	1.25%
2		0.324	0.324	0.322	0.323	0.405		
3		0.311	0.313	0.312	0.312	0.389		
1	0.6	0.471	0.472	0.471	0.471	0.596	0.597	0.5%
2		0.479	0.480	0.478	0.479	0.606		
3		0.470	0. 470	0. 471	0. 470	0.593		

يلاحظ أن الانزياح النسبي لمستويات التراكيز الثلاثة أقل من 5 % وبالتالي الطريقة تتمتع بمضبوطية جيدة .

4.6.2.1.3 المتانة (Robustness) :

سيتم التحقق من متانة هذه الطريقة بتغيير طول موجة الامتصاص ، حيث تم إجراء قياس للمحلول العياري (ذو التركيز 0.3 مكغ/مل) ثلاث مرات متتالية في كل طول موجة وحساب متوسط القياسات الثلاثة (n=3) ، فلم يلاحظ اختلاف هام في النتائج نتيجة تغيير طول الموجة مما يدل على متانة الطريقة التحليلية الجدول (35) يوضح نتائج تحديد متانة الطريقة.

جدول رقم (35) متانة الطريقة

متانة الطريقة بتغيير ثلاثة قيم مختلفة لطول موجة UV (λ_{max} = 420 ± 4 nm)		
Absorbance Mean±S.D		
Wavelenght (nm)	Standard (0.3μg/ml)	Selenium content (%)
416	0.229±0.001	98.4%
420	0.234±0.001	99.8%
424	0.232±0.001	98.9%

5.6.2.1.3 حدّ القياس الكمي (Limit of quantitation) :

تمّ تحديد حد القياس الكمي انطلاقاً من الخط البياني الممثل لتغيرات الامتصاص بتغير التركيز حيث يتم تحديده انطلاقاً من العلاقة :

$$LOQ = 10\,Sd(b)/a$$

حيث $Sd(b)$: هي الانحراف المعياري لنقطة تقاطع الخط المستقيم مع محور العينات.

a: هي ميل الخط المستقيم

ومنه نجد أنّ حد القياس الكمي يعادل 0.027 مكغ/مل .

6.6.2.1.3 حدّ الكشف (Limit of detection) :

$$LOD = 3.3\,Sd(b)/a$$

ومنه نجد أنّ حدّ الكشف يعادل 0.008 مكغ/مل .

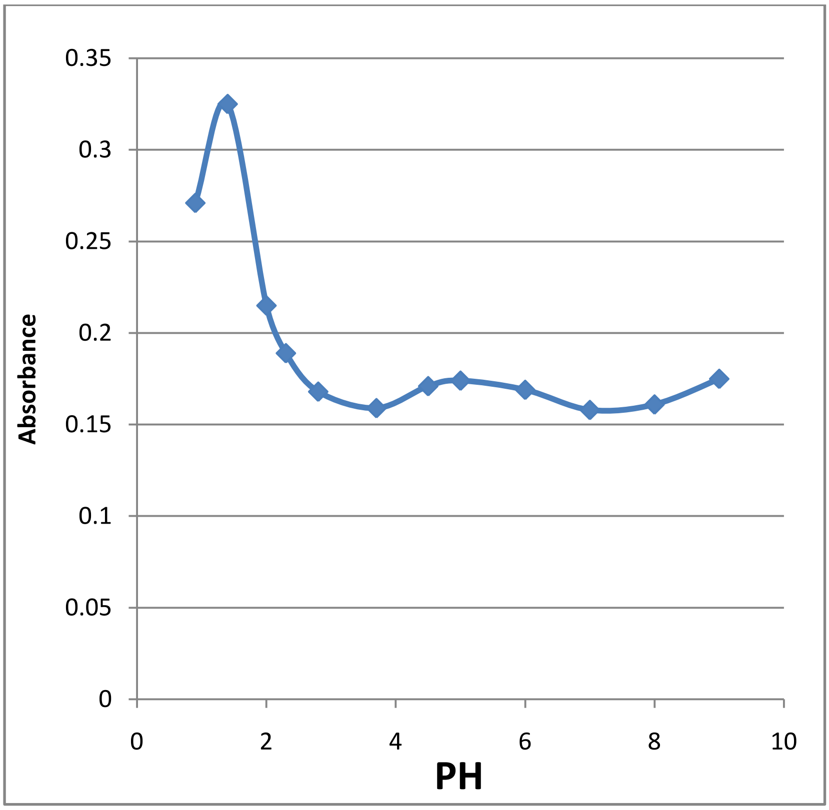
7.2.1.3 دراسة الشروط المثلى لمختلف العوامل المؤثرة في تشكيل معقد بيازسيلينول Piazselenol (Se - DAB) :

درسنا العوامل المؤثرة في تشكيل معقد ملون ثابت بين Se^{+4} وثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد. وذلك لتحديد الشروط المثلى من أجل التحديد الطيفي لهذه الشاردة ، حيث درسنا تأثير pHالوسط وتأثيردرجة الحرارة والزمن وتأثير تركيز ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد DABH وتأثير نوع محل الاستخلاص المستخدم وتأثير تسلسل الإضافات .

1.7.2.1.3 تأثير pH الوسط: pH Effect

تمت دراسة تشكل المعقد Se-DAB عند قيم pH مختلفة ضمن المجال 1-9 ، وذلك باستخدام محلول السيلينيوم ذو التركيز 0.4 µg/ml وذلك لتحديد درجة

pH المثلى لإعطاء أفضل النتائج . المحاليل المستخدمة لضبط درجة الـ pH هي حمض الكبريت H_2SO_4 0.5 mol/ml والنشادر المركز NH_3 .



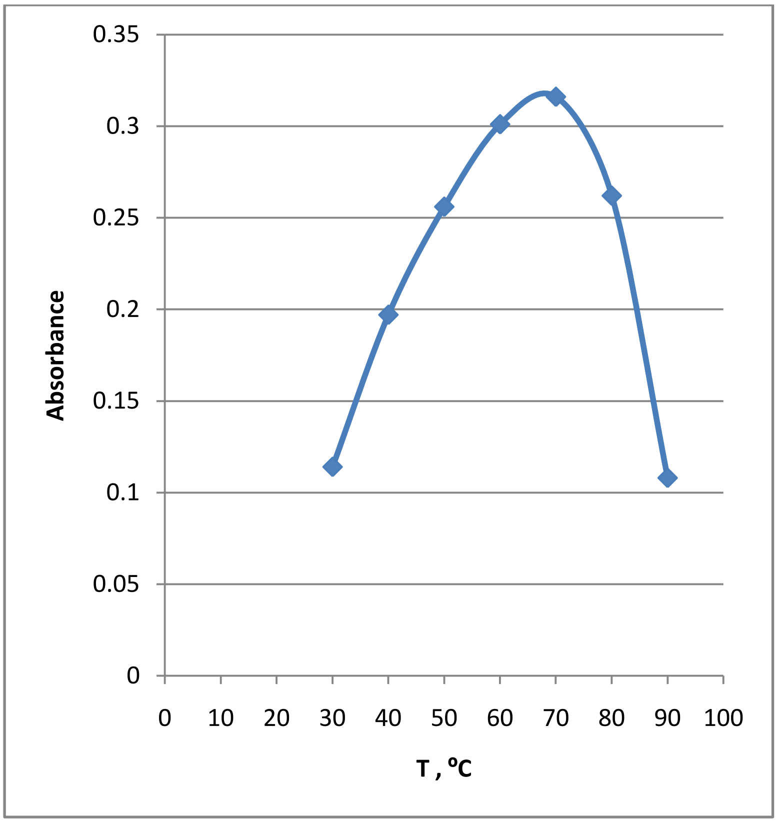
الشَّكل (18): تأثير درجة الـ pH على تشكل المعقد Se-DAB

من الشكل (18) نلاحظ أن درجة الـ pH المثلى لتشكل المعقد Se–DAB هي 1.5 ± 0.3

<u>2.7.2.1.3 تأثير الحرارة :</u> **Thermo Effect**

تمت دراسة تأثير الحرارة في تطور التفاعل اللوني (تشكل معقد بيازسيلينول Se-DAB). أخذ لهذه الغاية الأنبوب الرابع ذو التركيز 0.4 µg/ml ، فوجدنا أن سرعة تشكل المعقد المدروس بطيئة وتحتاج إلى زمن تشكل قدره 4 ساعات في الدرجة العادية من الحرارة .

لذلك تم تحضير المعقد بدرجات حرارة مختلفة 90 ^{o}C – 30 وقراءة قيم الامتصاصية للمعقد Se-DAB . يظهر لنا الشكل (19) درجة الحرارة المثلى لتشكل معقد بيازسيلينول Se-DAB .



الشَّكل(19): تأثير درجة الحرارة في امتصاصية المعقد Se-DAB

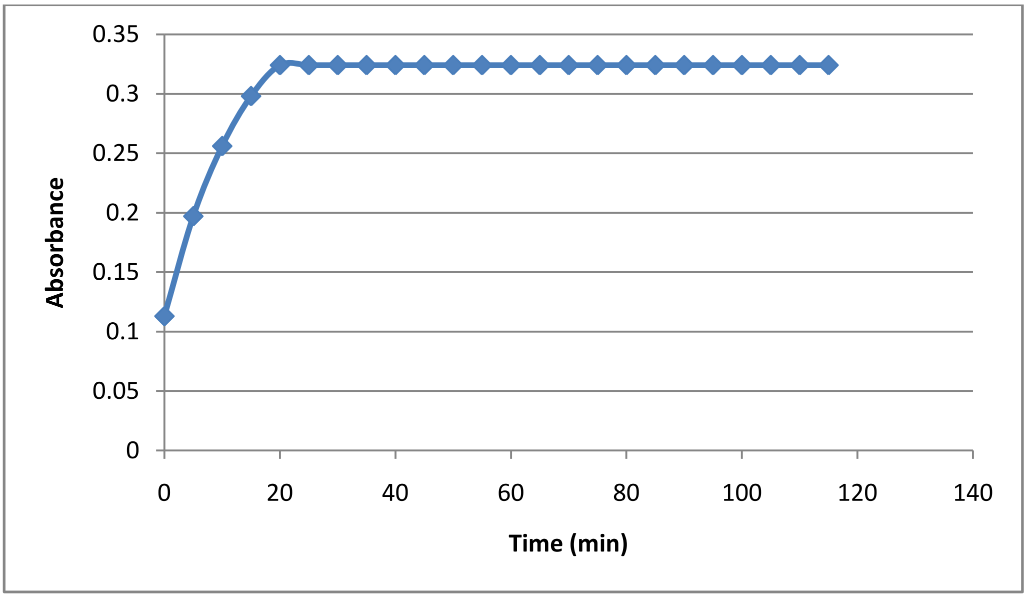
يظهر لنا الشكل (19) أن درجة الحرارة المثلى لتشكيل المعقد هي ^{0}**C** 70 درجة مئوية .

3.7.2.1.3 تأثير الزمن : Time Effect

لتحديد الزمن الأمثل اللازم لإتمام التفاعل ، قمنا بتثبيت درجة الحرارة عند الدرجة 70 ^{o}C وتم تحديد الامتصاص كل 5 دقائق اعتبارا من اللحظة (0) لحظة تطبيق التفاعل وذلك بهدف تحديد الزمن اللازم لتمام التفاعل . يظهر الشكل (20) والجدول (36) تغيرات الامتصاص مع الزمن .

الجدول (36) دراسة تأثير الزمن على تطور التفاعل

الزمن(د)	الامتصاص	الزمن(د)	الامتصاص	الزمن(د)	الامتصاص
0	0.118	**40**	0.324	**80**	0.324
5	0.198	**45**	0.324	**85**	0.324
10	0.256	**50**	0.324	**90**	0.324
15	0.293	**55**	0.324	**95**	0.324
20	0.324	**60**	0.324	**100**	0.324
25	0.324	**65**	0.324	**105**	0.324
30	0.324	**70**	0.324	**110**	0.324
35	0.324	**75**	0.324	**115**	0.324



الشّكل(20): تغيرات الامتصاص مع الزمن

يظهر لنا الشكل (20) أن الزمن الأمثل لتشكيل المعقد عند الدرجة **^{o}C** 70 هي 20 دقيقة.

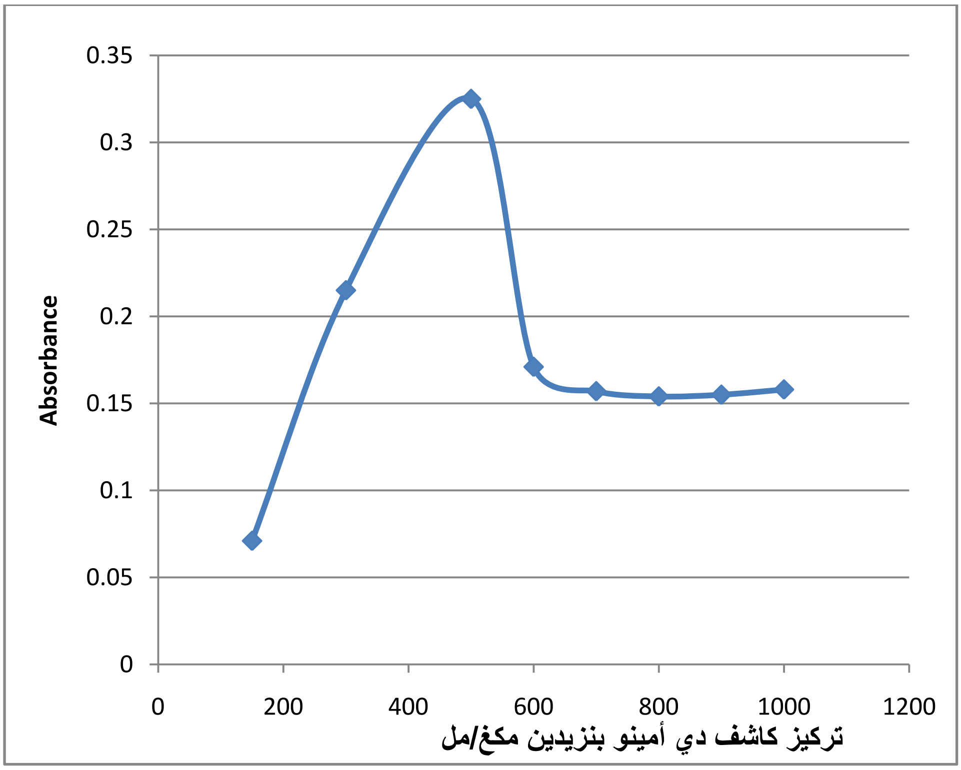
نستنتج مما سبق أنه بارتفاع درجة الحرارة ينخفض الزمن اللازم لتشكيل المعقد ، ويستمر ازدياد سرعة تشكل المعقد Se-DAB بارتفاع درجة الحرارة حتى 70 ºC ، حيث يحتاج تشكيله عند هذه الدرجة إلى 20 دقيقة فقط ، وبأعلى امتصاصية .

4.7.2.1.3 تأثير تركيز 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد DABH :

DABH Concentration Effect

تمت دراسة تـأثير تركيز 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد وذلـك بأخذ 0.5 مل منه بتراكيز مختلفة (3 , 5 , 7 , 10 mg/ml) باستخدام تركيز ثابت من السيلينيوم 0.4 µg/ml .

يظهر لنا الشكل (21) أن التركيز الأمثل من 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد لتشكيل المعقد Se-DAB هو 5 mg/ml . وذلك لأنه بالتراكيز المنخفضة تكون كمية الكاشف غير كافية لتشكيل المعقد ، وبالتراكيز المرتفعة يحصل تداخل .



الشكل (21): تأثير تركيز تركيز كاشف 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد DABH على تشكل المعقد Se-DAB

5.7.2.1.3 تأثير نوع محل الاستخلاص : Extract Solvent Effect

إن القطبية المنخفضة لمعقد بيازسيلينول Se-DAB تجعله قابلاً للاستخلاص بسهولة بمحل عضوي . تمت دراسة تأثير نوع محل الاستخلاص المستخدم باستخدام 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد DABH مع تركيز ثابت من السيلينيوم 0.4 µg/ml . استخدم لهذه الغاية محاليل استخلاص عضوية وهي :

- الكلـوروفــورم
- الـتـولـوين
- رابع كـلــور الكــربون
- الـبـنزن

بعد تطبيق التفاعل اللوني والحصول على معقد بيازسيلينول Se-DAB ، تم استخلاص المعقد بمحلات الاستخلاص السابقة الذكر وقراءة الامتصاص في كل مرة . وجدنا أنه بقياس الامتصاصية عند λ_{max} = 420 nm من أجل كل محل استخلاص ، يعطي المعقد Se-DAB المتشكل أعلى امتصاصية عند استخدام التولوين . يظهر لنا الجدول (37) امتصاصية المعقد Se- DAB من أجل كل محل استخلاص كلاً على حدة .

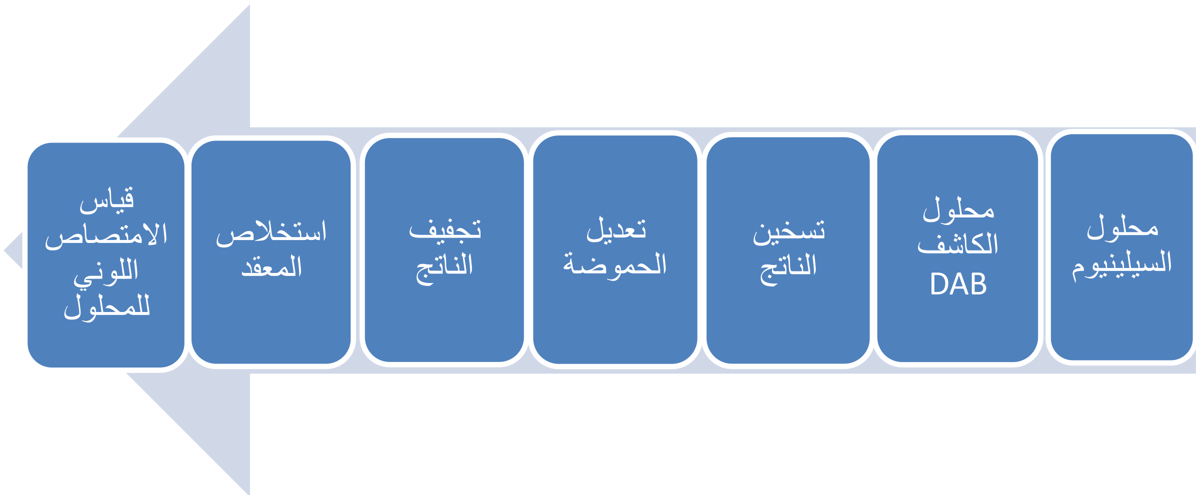
الجدول (37) تأثير نوع محل الاستخلاص

محل الاستخلاص	الامتصاص عند 420 nm
الكلوروفورم	0.291
التولوين	0.327
رابع كلور الكربون	0.115
البنزن	0.108

6.7.2.1.3 تأثير تسلسل الإضافات Reagent Consequence Effect

درسنا كافة احتمالات تسلسل الإضافات فوجدنا أن الاحتمال الأنسب الذي يؤدي إلى تشكيل معقد Se- DAB بأعلى امتصاصية بأفضل ثباتية هو إضافة محلول السيلينيوم – محلول 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد DABH – تسخين الناتج – ضبط الحموضة – استخلاص المعقد – تجفيف الناتج كما في الشكل (22) .

يوضح الشكل (22) تسلسل الإضافات الأنسب لأعلى امتصاصية وأفضل ثباتية للمعقد بيازسيلينول Se-DAB .



الشكل (22): تسلسل الإضافات الأنسب لأعلى امتصاصية وأفضل ثباتية

2.3 المقايسة باستخدام مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري :

Atomic Absorption Spectrophotometer (GFAAS) Graphite Furnace

1.2.3 الجهاز المستخدم :

جهاز الطيف الضوئي بالامتصاص الذري نوع Analytik Jena – ZEEnit700P

2.2.3 المحاليل المستخدمة (Solutions) :

- محلول ممدد من السيلينيوم بتركيز 100 مكغ/ل :

يحضر من محلول عياري أم stock solution (1000 مكغ/مل) حيث نأخذ 1 مل منه ويكمل إلى 100 مل بالماء المضاعف التقطير، فنحصل على محلول عياري من السيلينيوم تركيزه 10 مكغ/مل . ثم نأخذ 1مل منه ويكمل إلى 100 مل بالماء المضاعف التقطير فنحصل على محلول عياري ممدد من السيلينيوم تركيزه 100 مكغ/ل (0.1 مكغ/مل)، ثم يضاف له 0.5 مل من حمض الآزوت الكثيف .

- ماء مضاعف التقطير Double Distilled Water من إنتاج شركة Sigma Aldrich .

3.2.3 طريقة العمل (Procedure) :

- **تحضير السلسلة العيارية :**

نقوم بتحضير سلسلة عيارية بتراكيز (0.04 – 0.06 – 0.08 – 0.1 – 0.12 – 0.02) مكغ/مل وذلك بأخذ الحجوم المناسبة من محلول السيلينيوم الممدد ويوضع كل منها في بالون معاير سعة 10مل ، ثم يكمل الحجم إلى خط العيار بالماء المضاعف التقطير .

4.2.3 الشروط المستخدمة في مقايسة السيلينيوم بجهاز الامتصاص الذري (فرن الغرافيت) :

يبين الجدول (38) والجدول (39) الشروط المستخدمة في مقايسة السيلينيوم بجهاز الامتصاص الذري باستخدام فرن الغرافيت GFAAS.

الجدول (38) الشروط المستخدمة في مقايسة السيلينيوم بجهاز الامتصاص الذَّري الغرافيتي(GFAAS)

التقنية المستخدمة (Techniqe)	جدران/أنبوب الغرافيت Graphite tube/wall
طريقة الجهاز(Instrument mode)	Absorbance الامتصاص
طريقة المعايرة (Calibration mode)	Standard addition المضافات العيارية
طريقة القياس (Measurement mode)	Peak height ارتفاع القمم
المادة المُعَدِلة (Modifier)	5µl $Pd(No_3)_2$ 0.1% + $Mg(No_3)_2$ 0.05%
عرض الشق (Slit width)	nm1.2
طول الموجة (Wavelength)	196.0 nm
شدة تيار اللمبة (Lamp current)	6.0 mA
نوع اللمبة (Lamp type)	لمبة الهالوكاثود – السيلينيوم Hollow Cathode Lamp (HCl)- Se
مدة القياس (Measurement time)	2.0 s

الجدول (39) الشروط المستخدمة في مقايسة السيلينيوم بجهاز الامتصاص الذَّري الغرافيتي (GFAAS)

Furnace parameters

Step No	Temp (°C)	Time (s)	Gas Flow (L/min)	Read Command	Gas Type
1	85	5.0	3.0	NO	NORMAL
2	95	40.0	3.0	NO	NORMAL
3	120	10.0	3.0	NO	NORMAL
4	1200	5.0	3.0	NO	NORMAL
5	1200	1.0	3.0	NO	NORMAL
6	1200	2.0	3.0	NO	NORMAL
7	2500	0.7	0.0	YES	NORMAL
8	2500	2.0	0.0	YES	NORMAL
9	2500	1.0	3.0	NO	NORMAL

5.2.3 مصدوقية الطريقة (Method validation) :

1.5.2.3 تحديد الخطية (Linearity) :

قيسَت الامتصاصية الضوئية لكل من المحاليل المعيارية المحضرة ثلاث مرات عند طول موجة 196.0 نانومتر، أخذت القيمة المتوسِّطة، سجلت النتائج في الجدول (40) . ثم رسم الخط البياني لهذا الامتصاص وتم حساب قيمة معامل الإرتباط (correlation coefficient) R^2 للتحقق من وجود علاقة ارتباط بين التراكيز وقيم الامتصاص . وتم تحديد معادلة الارتداد الخطي **(Liner Regression Equation)** كما هو موضح بالشكل (23) .

الجدول رقم (40) امتصاصية أنابيب السلسلة المعيارية لمحلول السيلينيوم

التَّركيز ppm	الامتصاصيَّة 1	الامتصاصيَّة 2	الامتصاصيَّة 3	متوسِّط الامتصاصيَّة
0.02	0.059	0.059	0.060	0.059
0.04	0.093	0.094	0.095	0.094
0.06	0.150	0.151	0.149	0.150
0.08	0.179	0.179	0.179	0.179
0.1	0.218	0.219	0.219	0.218
0.12	0.257	0.256	0.255	0.256

جرى حساب قيمة معامل الارتباط R^2 (correlation coefficient) للتحقق من وجود علاقة ارتباط بين التراكيز وقيم الامتصاص ($R^2= 0.995$) وهي قريبة من الواحد وبالتالي هناك علاقة ارتباط بين التركيز وقيم الامتصاص ولتحديد نوع الارتباط نلجأ لتحديد قيمة ($F_{Significanc}$) من خلال تحليل الانحدار (Regression Statistics) وتحليل التباين ANOVA كما يظهر في الجدول (41) .

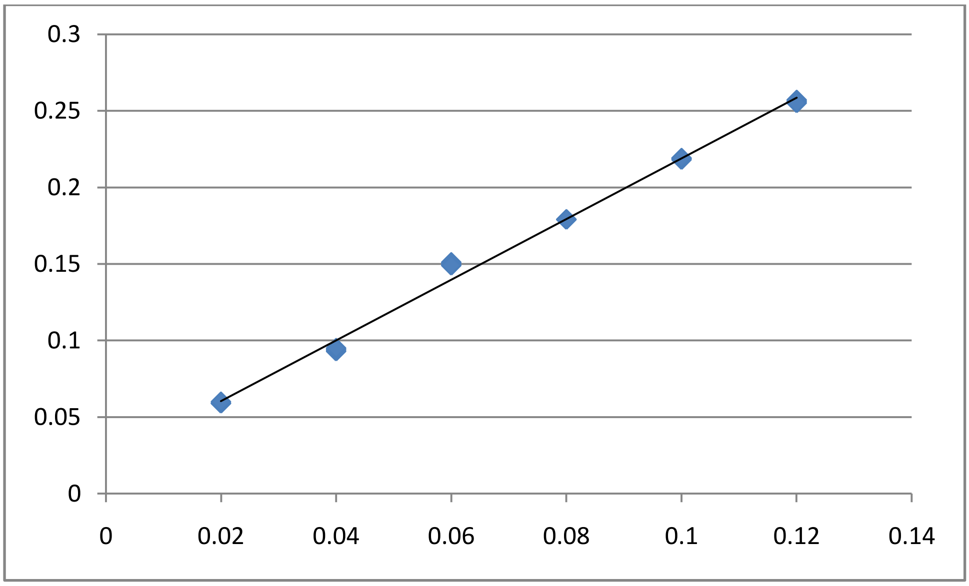
الجدول (41) تحليل التباين ANOVA

ANOVA					
	Df	*SS*	*MS*	*F*	*Significance F*
Regression	1	0.082368	0.082368	2861.893	1.8E-19
Residual	16	0.00046	2.88E-05		
Total	17	0.082829			

نجد من تحليل الانحدار السابق أن قيمة Significance F $=1.8\times10^{-19}$ أي أن هذه القيمة أصغر من مستوى الدلالة (0.05) وبالتالي نوع الارتباط بين قيم الامتصاص والتراكيز خطي ومن الجدول (42) يمكن كتابة معادلة الخط المستقيم على الشكل التالي (Y=1.98 X+0.02) ويظهر الشكل (23) معادلة الارتداد الخطي للطريقة المدروسة.

الجدول (42) تحديد معادلة الخط المستقيم

	Coefficients	*Standard Error*	*t Stat*	*P-value*	*Lower 95%*	*Upper 95%*
Intercept	0.02	0.002883	7.236609	1.99E-06	0.014754	0.026979
X Variable 1	1.98	0.037021	53.49666	1.8E-19	1.901996	2.058956



الشكل(23): معادلة الارتداد الخطي للطريقة المدروسة

2.5.2.3 الدقة (Precision) :

درست دقة الطريقة على مستويين من خلال دراسة: التكرارية ،والدقة الوسطى .

1.2.5.2.3 التكرارية (Repeatability) :

تم تحديد التكرارية على كامل مجال الدراسة للتراكيز الستة السابقة بواقع ثلاث مكررات لكل منها ويظهر الجدول (43) نتائج الاختبارات.

الجدول رقم (43) نتائج الاختبارات لتحديد التكرارية

الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي	التركيز العملي للسيلينيوم مكغ/مل	التركيز النظري للسيلينيوم مكغ/مل	المكررات
0.000153	0.019433	0.0196	0.02	1
		0.0194		2
		0.0193		3
0.000794	0.0374	0.0371	0.04	1
		0.0383		2
		0.0368		3
0.000651	0.062767	0.0621	0.06	1
		0.0634		2
		0.0628		3
0.001079	0.079667	0.0789	0.08	1
		0.0809		2
		0.0792		3
0.001665	0.100033	0.0987	0.10	1
		0.1019		2
		0.0995		3
0.001308	0.1208	0.1214	0.12	1
		0.1217		2
		0.1193		3

جرى تطبيق اختبار تجانس التباين (Cochran) والذي يعطى بالعلاقة :

$$C = \frac{VAR_{MAX}}{SUM(var)}$$

VAR_{Max}: أعلى مربع اللانحراف المعياري (Standard deviation).

Sum (var): مجموع مربعات الانحرافات المعيارية.

فكانت النتيجة (C=0.412) وبالمقارنة مع القيمة الحدية 0.561 نجد أن القيمة المحسوبة أقل من القيمة الحدية أي هناك تجانس بالتباين عبر مجال عمل الطريقة وبالتالي يعبر عن التكرارية بالانحراف المعياري 0.61 % والطريقة تتمتع بتكرارية جيدة .

2.2.5.2.3 الدقة الوسطى (Intermediate precision) :

لتحديدها تم تحضير محلول السيلينيوم بتركيز 0.08 مكغ/مل بواقع ثلاثة مكررات وعلى مدى ستة أيام ويظهر الجدول (44) نتائج التحليل للمكررات المختلفة.

الجدول (44) نتائج المكررات لتحديد الدقة الوسطى

المكررات	اليوم الأول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع	اليومالخامس	اليوم السادس
1	0.0792	0.0804	0.0796	0.0789	0.0806	0.0792
2	0.0791	0.0785	0.0807	0.0789	0.0787	0.0805
3	0.0796	0.0794	0.0805	0.0794	0.0809	0.0794

وللتأكد من عدم وجود فروق جوهرية بين النتائج جرى تحليل التباين ، ويظهر الجدول (45) النتائج على الشكل التالي :

الجدول (45) نتائج اختبار تحليل التباين

Days	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
Day 1	3	0.2391	0.0797	4.9E-07
Day 2	3	0.2402	0.080067	1.42E-06
Day 3	3	0.2372	0.079067	8.33E-08
Day 4	3	0.2408	0.080267	3.43E-07
Day 5	3	0.2383	0.079433	9.03E-07
Day 6	3	0.2379	0.0793	7E-08

ANOVA					
Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	F_{crit}
Between Groups	0.142081	5	0.028416	0.995347	3.105875
Within Groups	0.342589	12	0.028549		
Total	0.48467	17			

يلاحظ أن قيمة F المحسوبة أقل من قيمة F_{crit} أي أنه لا يوجد فارق جوهري بين النتائج واختلاف اليوم لم يؤد إلى اختلاف النتائج، ويكون RSD= 0.95%.

3.5.2.9 المضبوطية (Accuracy) :

حضرت تسعة محاليل من السلسلة المعيارية بالتراكيز التالية (- 0.08 -0.12 0.02) مكغ/مل ثلاثة محاليل لكل تركيز وذلك بأخذ الحجوم اللازمة من المحلول الممدد للسيلينيوم 100 مكغ/ل، ويوضع كل منها في بالون معاير سعة 10 مل، ثم يكمل الحجم إلى خط العيار بالماء المضاعف التقطير .

تم قياس الامتصاصية للعينات ثلاث مرات لكل عينة باستخدام الشروط المطلوبة، ثم حسبت القيمة المتوسطة . حسب التركيز العملي للسيلينيوم في كل مرة وذلك بتعويض قيم الامتصاصية في معادلة المستقيم التي تم الحصول عليها من منحني السلسلة المعيارية. سجلت النتائج في الجدول رقم (46) .

وتم تحديد معامل الانزياح النسبي (Relative Bias) لكل مستوى من مستويات التركيز السابقة والذي يعطى بالعلاقة التالية :

حيث X المتوسط الحسابي للتراكيز العملية ، Y التركيز النظري المحضّر

الجدول (46) متوسط الامتصاصية والتركيز العملي لكل من المحاليل المختلفة

المكررات	التَّركيز النَّظري للمحلول ppm	الامتصاصيَّة 1	الامتصاصيَّة 2	الامتصاصيَّة 3	متوسط الامتصاصية	التركيز العملي ppm	متوسط التركيز العملي ppm	الانزياح النسبي %
1	0.02	0.058	0.060	0.059	0.059	0.0197	0.0198	0.8 %
2		0.059	0.060	0.061	0.060	0.0203		
3		0.058	0.057	0.058	0.058	0.0195		
1	0.08	0.179	0.177	0.176	0.177	0.0795	0.079	1%
2		0.175	0.176	0.177	0.176	0.0789		
3		0.176	0.178	0.178	0.177	0.0792		
1	0.12	0.258	0.261	0.257	0.259	0.1210	0.121	0.5%
2		0.256	0.255	0.256	0.256	0.1191		
3		0.261	0. 263	0. 259	0. 261	0.1217		

يلاحظ أنّ الانزياح النسبي لمستويات التراكيز الثلاثة أقل من 5% وبالتالي الطريقة تتمتع بمضبوطية جيدة .

4.5.2.3 حدّ القياس الكمي (Limit of quantitation) :

تم تحديد حد القياس الكمي انطلاقاً من الخط البياني الممثل لتغيرات الامتصاص بتغير التركيز حيث يتم تحديده انطلاقاً من العلاقة :

حيث $Sd(b)$: هي الانحراف المعياري لنقطة تقاطع الخط المستقيم مع محور العينات.

a: هي ميل الخط المستقيم

ومنه نجد أنّ حد القياس الكمي يعادل 0.0041 مكغ/ل

5.5.2.3 حدّ الكشف (Limit of detection):

$$LOD = 3.3\, Sd(b)/a$$

ومنه نجد أنّ حدّ الكشف يعادل 0.00133 مكغ/مل

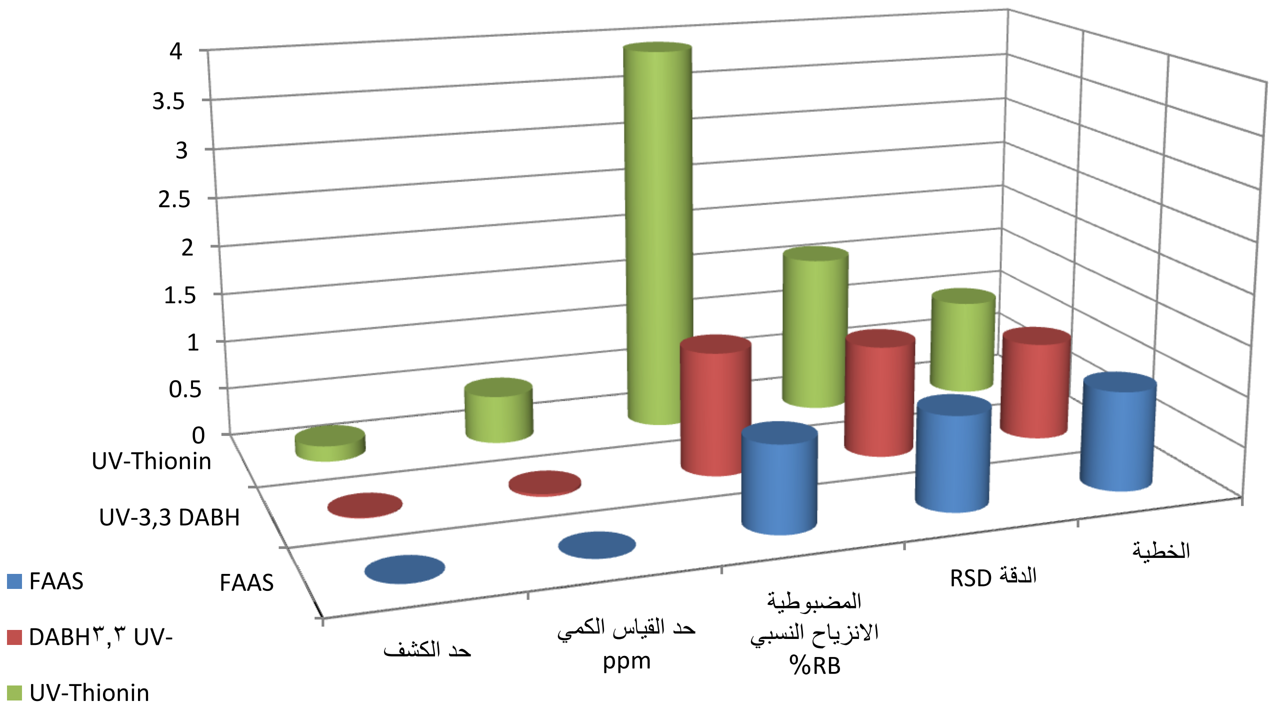
النتائج و المناقشة

Result & Discussion

1

مقارنة الطرائق التحليلية المستخدمة لمقايسة السيلينيوم واختيار الطَّريقة الأمثل :

لتحديد أفضل طريقة لمقايسة السيلينيوم ، تمت المقارنة بين الطرائق المدروسة من حيث الدقة ، المضبوطية ، حد الكشف ، حد القياس الكمي والخطية كما هو موضح في الشكل (24) والجدول (47) .



الشكل (24) مقارنة الطرائق التحليلية المستخدمة لمقايسة السيلينيوم

الجدول (47) مقارنة الطرائق التحليلية المستخدمة لمقايسة السيلينيوم

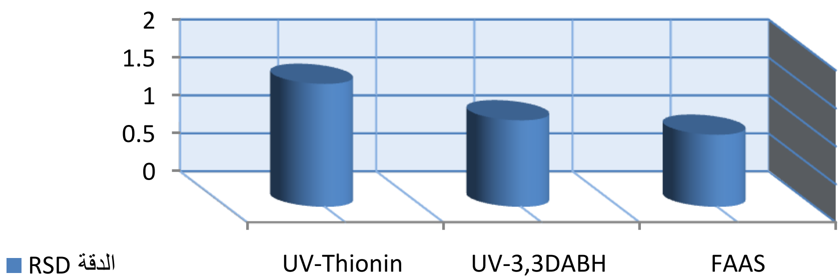
	الخطية R	الدقة RSD	المضبوطية الانزياح النسبي RB%	حد القياس الكمي ppm	حد الكشف Ppm
UV- Thionin	0.995	1.62	3.93	0.49	0.16
UV- 3,3DABH	0.999	1.14	1.25	0.027	0.008
GFAAS	0.997	0.95	0.87	0.0014	0.00127

1.1 مقارنة الطرائق من حيث الخطية :

لدى دراسة خطية الطرائق التحليلية السابقة باستخدام طريقة Least square للارتباط أبدت جميع الطرائق خطية جيدة حيث بلغت قيمة معامل الارتباط R بالنسبة لطريقة UV-Thionin 0.995 ولطريقة UV-3,3DABH 0.997 ولطريقة GFAAS 0.997 ، وبالتالي تعد الطرائق السابقة متماثلة من حيث الخطية ولا يمكن اعتماد الخطية لتحديد أفضل هذه الطرائق للمقايسة لأن الطرائق المدروسة جميعها أبدت خطية جيدة .

2.1 مقارنة الطرائق من حيث الدقة :

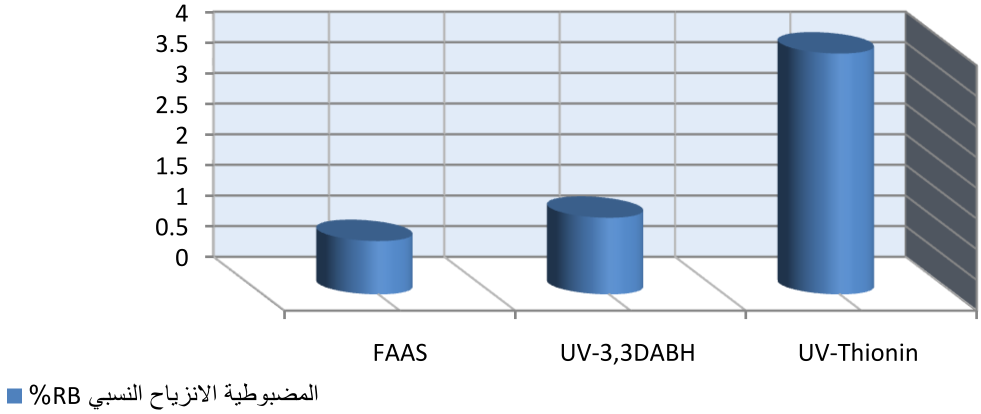
لدى دراسة دقة الطرائق التحليلية السابقة - التي تمثل مدى توافق (Closeness of Agreement) وتناغم نتائج الاختبارات الإفرادية فيما بينها عند تطبيق عدد من القياسات على المادة وباعتيان متكرر على العينة نفسها - اعتماداً على قيم الانحراف المعياري النسبي، تبين أن طريقة الـ GFAAS هي الأفضل لأنها تتمتع بأقل انحراف معياري نسبي، فقد بلغت قيمته 0.95 كما هو مبين في الشكل (25) ، في حين كانت طريقة UV-Thionin الأقل دقةً لأن قيمة الانحراف المعياري النسبي لها هي الأعلى 1.62، وكان الانحراف المعياري النسبي لطريقة UV-3,3DABH 1.14 ، يمكن أن يعزى ارتفاع قيمة الانحراف المعياري النسبي للطرائق اللونية إلى مراحل العمل الكثيرة بالإضافة إلى أن التعامل مع محاليل الحموض والقلويات الكثيفة قد يزيد الخطأ الناتج عن المحلل .



الشكل (25) مقارنة الطرائق التحليلية المستخدمة لمقايسة السيلينيوم من حيث الدقة

3.1 مقارنة الطرائق من حيث المضبوطية :

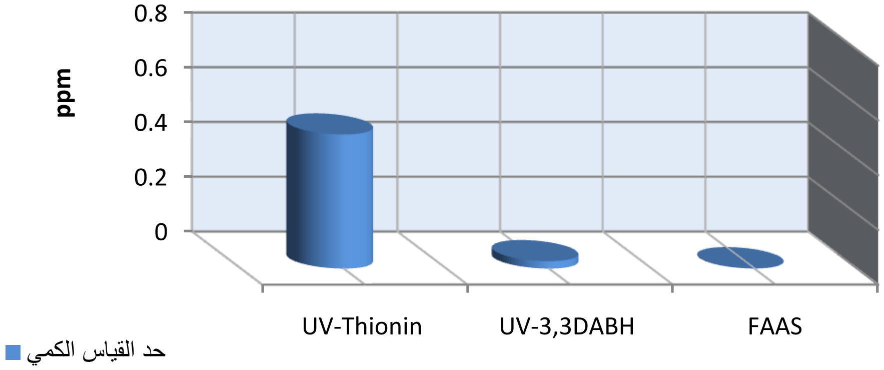
لدى دراسة الطرائق التحليلية السابقة من حيث المضبوطية اعتماداً على حساب الانزياح النسبي RB% ، تبين أن طريقة الـ GFAAS هي الأفضل لأنها تتمتع بأقل ان زياح نسبي فقد بلغت قيمته 0.87% ، في حين كانت طريقة UV-Thionin الأقل مضبوطية حيث كانت قيمة الانزياح النسبي لها هي الأعلى 3.93% ، وكان الانزياح النسبي لطريقة UV-3,3DABH 1.25% ، كما هو موضح في الشكل (26) .



الشكل (26) مقارنة الطرائق التحليلية المستخدمة لمقايسة السيلينيوم من حيث المضبوطية

4.1 مقارنة الطرائق من حيث حد القياس الكمي :

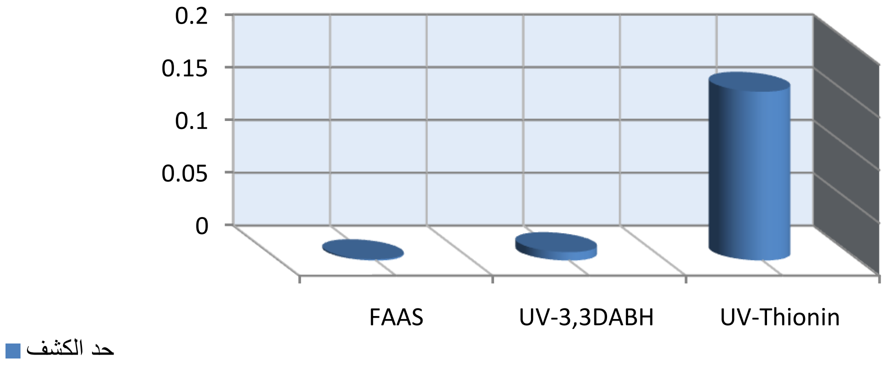
عند مقارنة الطرائق التحليلية من حيث حد القياس الكمي أو التركيز الأقل من السيلينيوم والذي يمكن قياسه بدقة ومضبوطية مقبولتين وُجد أن طريقة الـ GFAAS هي الأفضل لأنها تمكن من مقايسة تراكيز تصل إلى 0.0014 ppm أما حد القياس الكمي عند المقايسة ب UV-3,3DABH فهو 0.027 ppm ، وكانت طريقة UV-Thionin هي الأسوأ لأنها لا تمكن من مقايسة تراكيز أقل من 0.49 ppm كما هو موضّح في الشكل (27) .



الشكل (27) مقارنة الطرائق التحليلية المستخدمة لمقايسة السيلينيوم من حيث حد القياس الكمي

5.1 مقارنة الطرائق من حيث حد الكشف :

عند مقارنة الطرائق التحليلية من حيث حد الكشف أو التركيز الأقل الذي يمكن كشفه من السيلينيوم ، دون أن يتم تعيينه كمياً وُجِد أن طريقة الـGFAAS هي الأفضل لأنها تمكّن من كشف تراكيز تصل إلى 0.00127 ppm أما حد الكشف عند المقايسة بطريقة UV-3,3DABH فقد كان 0.008 ppm وكانت طريقة UV-Thionin هي الأسوأ لأنها لا تمكن من كشف تراكيز أقل من 0.16 ppm كما هو موضّح في الشكل (28) .



الشكل (28) مقارنة الطرائق التحليلية المستخدمة لمقايسة السيلينيوم من حيث حد الكشف

6.1 نوعية الطريقة :

تم إجراء تحديد كمي للسيلينيوم في عينات المتممات الغذائية باستخدام طريقة GFAAS ، وقورنت النتائج مع مثيلاتها الناتجة عن استخدام طريقة UV-3,3DABH وذلك بعد استخلاص السيلينيوم بطريقة الهضم بالأشعة الماكروية microwave digestion . الجدول (48) يظهر مقارنة بين نتائج القياس لطريقة الامتصاص الذري GFAAS وطريقة مقياس الطيف الضوئي UV-3,3DABH.

الجدول رقم (48) مقارنة نتائج الامتصاص الذري ومقياس الطيف الضوئي للعينات المقاسة

المتمم الغذائي	متوسط التركيز* GFAAS مكغ/غ	متوسط التركيز* UV-3,3DABH مكغ/غ
A	34.6	35.8
B	99.2	98.9

* حسب التركيز اعتماداً على ثلاثة مكررات لكل خلاصة ، ثم حساب القيمة المتوسطة

تبين النتائج السابقة أن التراكيز الناتجة عن مقايسة السيلينيوم في عينات المتممات الغذائية بجهاز الطيف الضوئي باستخدام 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد UV-3,3DABH كانت متقاربة مع التراكيز الناتجة عن المقايسة بجهاز الطيف الضوئي بالامتصاص الذري GFAAS ، وبالتالي فإنّ استخدام طريقة الإضافات (Addition method) لإنشاء المنحني العياري وخاصة في طرق المقايسة باستخدام جهاز الطيف الضوئي قد ساعدت على إلغاء التداخلات وإعطاء صفة النوعية ، التي يتمتع بها أيضاً جهاز الامتصاص الذري GFAAS حيث يعاير كل معدن فيه على طول موجة خاصة ومميزة له بالإضافة إلى أن المنبع نوعي حسب طبيعة العنصر مما يمنع تدخل المعادن الشائبة الأخرى .

▪ النتيجة:

تبيّن النتائج السابقة أن طريقتي مقايسة السيلينيوم باستخدام كل من جهاز مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري GFAAS وجهاز مقياس الطيف الضوئي باستخدام 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد UV-3,3DABH ذات تكرارية جيدة وحساسية أعلى من طريقة UV-Thionin ، كما أن كلا الطريقتين تتمتعان بالنوعية . ولكن تتميز طريقة GFAAS بسهولة العمل وبقصر زمن التحليل حيث يستغرق قياس العينة بضع دقائق فقط في حين يحتاج قياس العينة باستخدام طريقة UV-3,3DABH مدة 30 دقيقة تقريبا .

وبالتالي تم اعتماد طريقة مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري GFAAS في بحثنا ، لمقايسة السيلينيوم في عينات المتممات الغذائية .

2

مقايسة السيلينيوم في العينات باستخدام جهاز GFAAS :

1.2 تحضير العينات :

أُخدت عدة وزنات من مسحوق العينة بوزن 1غرام ، أضيف لكل منها 8 µg من السيلينيوم العياري باستخدام المحلول الممدد للسيلينيوم ذي التركيز 10 ppm . وذلك لأن طريقة الإضافة Addition method تجريبياً أعطت نتائج أكثر دقة مقارنة مع نتائج العينات بدون أيّة إضافة. استخلصت العينات باستخدام طريقة الهضم بالأشعة الماكروية (microwave digestion) .

2.2 طريقة العمل والقياس :

قيست الامتصاصية الضوئية لكل خلاصة ثلاث مرات* ، وأخذت القيمة المتوسطة ، ثم عوضت هذه القيمة في معادلة المستقيم التي تمَ الحصول عليها من منحني السلسلة المعيارية، وحُسب بذلك متوسط تركيز السيلينيوم في كل خلاصة .

*يعطي الجهاز تلقائياً ثلاث امتصاصيات ضوئية لكل خلاصة، ويعطي القيمة المتوسطة .

3.2 النتائج :

يوضح الجدول (49) نتائج مقايسة السيلينيوم في عينات المتممات الغذائية (المتمم A والمتمم B) .

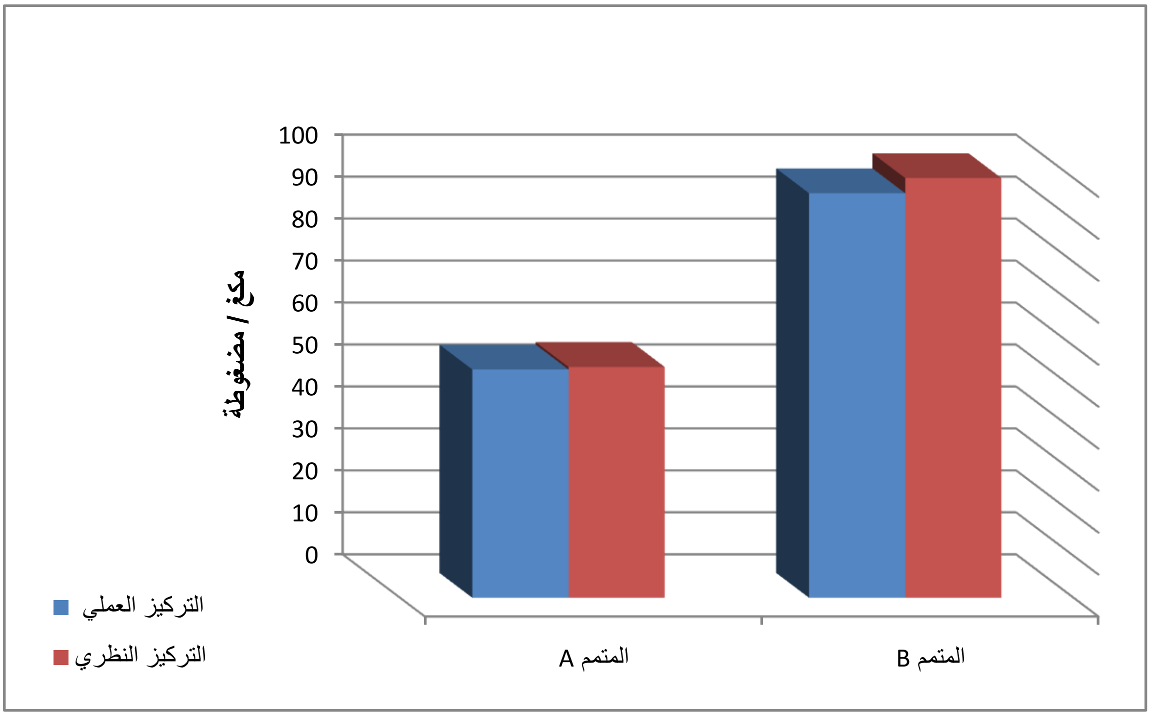
الجدول رقم (49) نتائج مقايسة السيلينيوم في عينات المتممات الغذائية

المتمم الغذائي	العينة الأولى متوسط الامتصاصية	العينة الثانية متوسط الامتصاصية	العينة الثالثة متوسِط الامتصاصية	متوسِّط الامتصاصية	التركيز العملي في العيِنة ppm
A	0.105	0.106	0.104	0.105	0.043
B	0.223	0.225	0.224	0.224	0.103

- قورنت النتائج مع التراكيز المصرح بها على لصاقة المتممات الغذائية كما بالشكل (29) ، وسجلت النتائج في الجدول (50) .

الجدول (50) مقارنة التركيز العملي للسيلينيوم مع التركيز المصرح به على لصاقة المتمم الغذائي

رمز المنتج	التركيز العملي مكغ/مضغوطة	التركيز المصرح به مكغ/مضغوطة
A	54.4	55
B	99.2	100



الشكل (29) مقارنة التركيز العملي للسيلينيوم مع التركيز المصرح به على لصاقة المتمم الغذائي

3

النتيجة العامة Conclusion :

من خلال دراستنا السابقة التي تمت على عينات من المتممات الغذائية لتحديد محتوى هذا المتممات بالسيلينيوم ، استطعنا أن نَخلُص إلى النتائج التالية :

- بعد استعراض طرائق الاستخلاص ومن خلال دراستنا تبين أن طريقة الهضم باستخدام الأشعة الماكروية (microwave digestion) أفضل من طريقة الترميد (الجاف والرطب) لاستخلاص السيلينيوم من عينات المتممات الغذائية ، حيث كانت هذه الطريقة أسرع ، أسهل استخداماً و تتميز بتوفير كميات كبيرة من المحلات اللازمة للاستخلاص، وذات تكرارية أفضل بالإضافة إلى أنها تعطي مردود 99.6% وهو أعلى من مردود طريقة الترميد (الجاف والرطب) ، ومن حيث السلامة هي الأكثر أماناً.

- بعد المقارنة بين الطرائق التحليلية المستخدمة في دراستنا توصلنا إلى مماثلة طريقة مقياس الطيف الضوئي باستخدام 3،3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد UV-3,3DABH للنوعية التي يتمتع بها جهاز الامتصاص الذري GFAAS وذلك عند استخدام طريقة الإضافات Addition method والتي ساعدت على إلغاء التداخلات الكبيرة التي يتصف بها جهاز Spectrophotometric عادة .
لكن من خلال عملنا فقد تبين أن طريقة المقايسة باستخدام جهاز الطيف الضوئي بالامتصاص الذري كانت أفضل الطرائق المدروسة لمقايسة السيلينيوم حيث أن هذه الطريقة أسرع وأسهل استخداما .

- بينت الدراسة وجود تقارب كبير مابين النتائج العملية التي حصلنا عليها والتراكيز المصرح بها على لصاقات المتممات الغذائية .

التوصيات والمقترحات

Recommendatios & Suggestions

التوصيات والمقترحات :

نتيجة لهذه الدراسة نوصي بما يلي:

- اعتماد طريقة الهضم بالأشعة الماكروية (microwave digestion) في استخلاص السيلينيوم من المتممات الغذائية وذلك بعد أن تبين أنها أفضل من طريقة الترميد (الرطب والجاف) . حيث كانت طريقة الهضم بالأشعة الماكروية أسرع ، أسهل وتتميز بتوفير كميات كبيرة من المحلات اللازمة للاستخلاص وذات تكرارية أفضل بالإضافة إلى أنها تعطي مردود 99.6% وهو أعلى من مردود طريقة الترميد الجاف والرطب .

- استخدام جهاز الطيف الضوئي بالامتصاص الذري Atomic Absorption Spectrophotometric (GFAAS) في مقايسة السيلينيوم بعد أن تبين أنها أسهل وأسرع الطرق المدروسة ، بالإضافة إلى أنها تتمتع بتكرارية جيدة وحساسية عالية .

- في حال عدم توفر جهاز الطيف الضوئي بالامتصاص الذري GFAAS ، نوصي بتطبيق جهاز مقياس الطيف الضوئي باستخدام 3،3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد كجهاز تقليدي متوفر في كل المخابر العلمية حيث تعتبر طريقة عالية الحساسية في مقايسة السيلينيوم وخاصة بعد إلغاء التداخلات فيه باستخدام طريقة المنحني العياري بالإضافات (Addition method) .

- تعميم نتائج البحث إلى الجهات الرقابية المسؤولة عن مراقبة جودة المتممات الغذائية المنتشرة في السوق السورية بهدف زيادة الاهتمام بتراكيز المعادن الزهيدة الموجودة في المتممات الغذائية حرصاً على صحة وسلامة المستهلك .

- ضرورة إعطاء السيلينيوم أهمية أكبر كعنصر ضروري في مختلف مراحل العمر.

- توجيه الانتباه إلى الأمراض التي تنتج عن نقص الوارد من السيلينيوم سواء بالتشخيص أو بالعلاج نظراً لغياب الاهتمام بقياسات السيلينيوم المخبرية.

- التأكيد على أهمية تناول المتممات الغذائية خاصة عند الأشخاص الذين يعانون من سوء التغذية .

- الاهتمام بشكل عام بالتغذية الصحية السليمة لتأمين الحاجة الضرورية من جميع العناصر الغذائية وخاصة الزهيدة.

- ضرورة إجراء مراقبة دورية لقيم السيلينيوم عند كل شخص تجنباً لحالة نقص السيلينيوم .

- متابعة الدراسة على المتممات الغذائية من حيث وجود المعادن الأخرى الزهيدة مثل : الكروم (Chromium) ، الموليبدنيوم (Molybdenum) ، النيكل (Nickel) والفاناديوم (Vanadium) ، لما لها أهمية لصحة الإنسان .

الملخص

Summary

الملخص :

تهدف الدراسة لإجراء مقارنة بين الطرائق التحليلية المستخدمة لمقايسة السيلينيوم في المتممات الغذائية ، وهي : طريقة مقياس الطيف الضوئي (باستخدام كاشف الثيونين وكاشف 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد) وطريقة مقيا س الطيف بالامتصاص الذري .

وقد تم إجراء مقارنة أيضاً بين طرائق الهضم الثلاثة : الترميد الجاف والترميد الرطب والهضم بالأشعة الماكروية ، والمستخدمة لاستخلاص السيلينيوم من عينات المتممات الغذائية .

بينت نتائج الدراسة ما يلي :

- أظهرت طريقة الهضم بالأشعة الماكروية المستخدمة لاستخلاص السيلينيوم من عينات المتممات الغذائية تكرارية أكبر ونسبة مردود أعلى من طريقتي الترميد الجاف والترميد الرطب . فقد بلغ متوسط مردود طريقة الهضم بالأ شعة الماكروية 99.6% .
- بعد المقارنة بين الطرائق التحليلية المستخدمة في دراستنا توصلنا إلى أن طريقة مقياس الطيف الضوئي باستخدام 3,3 ثنائي أمينو بنزيدين هيدروكلورايد UV-3,3DABH تتمتع بنوعية مشابهة للنوعية التي يتمتع بها جهاز الامتصاص الذري GFAAS وذلك عند استخدام طريقة الإضافة والتي ساعدت على إلغاء التداخلات الكبيرة التي يتصف بها جهاز مقياس الطيف الضوئي .

  لكن من خلال عملنا فقد تبين أن طريقة المقايسة باستخدام جهاز الطيف الضوئي بالامتصاص الذري كانت أفضل الطرائق المدروسة لمقايسة السيلينيوم حيث أن هذه الطريقة أسرع وأسهل استخداما .
- بينت الدراسة وجود تقارب كبير مابين النتائج العملية التي حصلنا عليها والتراكيز المصرح بها على لصاقات المتممات الغذائية .

Abstract :

The purpose of this study was to compare two analytical methods for selenium determination in food supplements : Spectrophotometry (using Thionin and 3,3 diaminobenzidine hydrochloride a chromogenic reagent) and Atomic absorption spectrophtometry .

A comparative evaluation between three digestion methods for selenium extraction from food supplements : dry ashing, wet ashing , microwave digestion , have been studied also .

The outcomes of the study reveal the following :

- The study of sample preparation procedures showed that the microwave method was the best . The microwave digestion reveal higher repeatability and recovery than dry ashing and wet ashing . The average recovery of microwave digestion was 99.6% .
- After comparing between two analytical methods which applied in our study , the results have shown that spectrophotometric method using 3,3 diaminobenzide hydrochloride reveal specificity similar to atomic absorption spectrophotometric method , when we used the addition method which cancel the major interference in spectrophotometric method using 3,3 diaminobenzidine hydrochloride.
- The results have shown that practical results of our study close to the amount of selenium in food supplements lable

المراجع
References

(1) Ransley JK. Donnelly NW. Food and Nutritional supplements: their role in health and disease. Berlin: *Springer-Verlag*,2001.
(2) Reilly C. Selenium in food and health. 2nd ed. New York: *Springer*,2006.
(3) Trofast J. Berzelius' Discovery of Selenium. *Chemistry International.*2011 ; **33** (5): 16–19 .
(4) Minaev V. S, Timoshenkov S. P and Kalugin V. V. Structural and Phase Transformations in Condensed Selenium . *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials,* 2005; 7(4):1717–1741.
(5) Petrucci, Ralph H. General Chemistry. 9th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2007.
(6) Rezanka T and Sigler K . Biologically active compounds of semi-metals . *Phytochemistry*. 2008; 69, 585 – 606.
(7) White P. J, Bowen H. C, Marshall B and Broadley M. R . Extraordinarily high leaf selenium to sulphur ratios define "Se-accumulator" plants. *Annals of Botany*,2007 ; 111-118
(8) Holleman A. F and Wiberg E. Inorganic Chemistry" Academic Press: San Diego, 2001.
(9) De A. K. A Text Book of Inorganic Chemistry. New Age International. 2003; 543–545.
(10) House J. E. Inorganic chemistry. Academic Press; 2008: 524 .
(11) Zang B, Xu H and Yu J. Determination of Total Gaseous Selenium in Atmosphere by Honeycomb Denuder Differential Pulse Cathodic Stripping Voltammetry . *Journal of Talanta*, 2002;57:323-331 .

(12) Valinen H, Klosterkotter W, Lehnert G, Petry H, Ruteneranz J, Weber G, Wenzel H. G, Wittgens H and Woitowitz H. J. Medycyna Pracy . 1985.

(13) Sors T. G, Ellis D. R, et al. *Plant Journal*, 2005*;*12 (4):392-401

(14) Dhillon K. S, Dhillon S. K. Distribution and management of seleniferous soils. *Advances in Agronomy*, 2003; 79: 119–184.

(15) Rayman M. P. The importance of selenium to human health. *The Lance,* 2000*;*356: 233-241.

(16) Popa Gr. T. Selenium content in foodstuffs and its nutritional requirement for humans 2012. *Clujul Medical*, 2012; 85.

(17) Reilly C. Metal contamination of food. 3rd ed. Oxford, London UK 2002

(18) BNF (2001) Briefing paper : Selenium and Health, 5. British Nutrition Foundation, London.

(19) Navarro A. M, Cabrera V. C. Selenium in food and the human body. *Sci Total Environ*, 2008; 400:115-141.

(20) Moreno M. J, Cala R. V, Jimenez B. R . Selenium distribution in topsoils and plants of a semi-arid Mediterranean environment. *Environ Geochem Health*, 2005; 27:513-519.

(21) Longnecker M. P, Taylor P. R, Levander O.A, Howe M, Veillon C, McAdam P. A, Patterson K. Y, Holden J. M, Stampfer M. J, Morris J. S, Willett W. C. Selenium in diet, blood and toenails in relation to human health in a seleniferous area. *Am J Clin Nutr,* 1991;53:1288-94.

(22) Pyykko K, Tuimala R, Kroneld R, et al. Effect of selenium supplementation to fertilizers on the selenium status of the population in different parts of Finland . *Eur J Clin Nutr*, 1988; 42:571-579.

(23) Hamilton S. J. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Total Environ*, 2004; 326:1-31.

(24) Dumont E, Vanhaecke F, Cornelis R . Selenium speciation from food source to metabolites. *Anal Bioanal Chem,* 2006; 385:1304-1323.

(25) Al-Ahmary K. M. Selenium content in selected foods from the Saudi Arabia market and estimation of the daily intake. *Arab J Chem*, 2009; 2:95-99.

(26) Ventura M. G, Stibilj V, Freitas M. C, Pacheco A. Determination of ultratrace levels of selenium in fruit and vegetable samples grown and consumed in Portugal. *Food Chem*, 2009; 115: 200-206.

(27) Choi Y, Kim J, Lee H. S, et al . Selenium content in represen-tative Korean foods. *J Food Compos Anal,* 2009; 22:117-122.

(28) Zachara B. A, Pawluk H, et al . Tissue Level, Distribution and Total Body Selenium Content in Healthy and Diseased Humans , *Archives of Environmental Health* , 2001 ;56: 461 – 466.

(29) McConnell K.P, Broghamer W. L, Blotcky A. J and Hurt O. J. Selenium levels in human blood and tissues in health and in disease. *J. Nutr*, 1975; 105: 1026.

(30) Denis M. M, Robert E. C. Advanced Human Nutrition. 2nd ed , 2011.

(31) Gmoshinskiĭ I.V, Mazo V. K. Mineral substance in human nutrition. Selenium: absorption and bioavailability. *Vopr Pitan*. 2006;75 (5):15-21.

(32) Groff J. L, Gropper S. S and Hunt S. M Microminerals. In: Advanced Nutrition and Human Metabolism. Minneapolis: West Publishing Company, Minneapolis, 1995; 381-384.

(33) Daniels L. A. Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem*, 1996;54:185-199.

(34) Jacques K. A. Selenium metabolism in animals: the relationship between dietary selenium form and physiological response. In: Science and Technology in the Feed Industry. 2001; 319-348.

(35) Lobinski R, Edmonds J. S, Suzuki K. T, et al . Species-selective determination of selenium compounds in biological materials. *Pure Appl Chem*, 2000;72(3):447-461.

(36) Burk R. F and Levander O. A . Selenium. In: Modern Nutrition in Health and Disease .9th ed. 1999; 265-276.

(37) Combs G. F and Lu L. Selenium as a cancer preventative agent Selenium: its moelcular biology and role in human health. *Kluwer AcedemicPublishers, Norwell*. 2001;205-217.

(38) Sunde R. A . Selenium present knowledge in nutrition. 9th ed. Washington. 2006;480–497.

(39) Perry k , Wiseman J . The bioavailability of Selenium enriched milk proteins. *University of Nottingham , UK* . 2008 .

(40) Berlau J, Geli M. and Pool-Zobel B. L . Colon cancer risk factors from nutrition. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2004;378: 737-743.

(41) Beck M. A, Levander O, Handy J. Selenium deficiency and viral infection. *Journal of Nutrition,* 2003;133: 1463s-1467s.

(42) Meglia G. E, Holtenius K, Petersson L, Ohagen P, Persson W. K . Prediction of Vitamin A, Vitamine E, Selenium and Zinc Status of Periparturient Diary Cows Using Blood Sampling During the Mid Dry Period . *Journal of Acta Vet Scand* , 2004 *;*24,119-128.

(43) Zimmerman M. B and Kohrle J. The impact of iron and selenium deficiencies on iodine and thyroid metabolism : biochemistry and relevance to public health. 2002;12:867-78.

(44) Goldhaber S. B. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2003;38 :232.

(45) Pugh D. G. *Sheep and Goat Medicine*. Philadelphia: Saunders. 2002.

(46) Standing Committee on the Evaluation of Dietary Reference Intakes of the Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, the National Academies and Health Canada : Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids, Washington, DC: National Academy Press. 2000.

(47) Garttner R , et al . Selenium supplement in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentration . *J. Clin Endocrinol Metab*, 2002;87, 1687-1691.

(48) Thomson C. D. Selenium and iodine intakes and status in New Zealand and Australia. *Br J Nut* , 2004;*91,* 661-672.

(49) Gladyshev VN. Selenoproteins and selenoproteomes. In: Hatfield D. L, Berry M. J, Gladyshev V. N. Selenium: Its molecular biology and role in human health. 2nd ed. New York: *Springer*; 2006:99-114.

(50) Reeves M. A, Hoffmann P. R . The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66:2457-2478.

(51) Ursini F, Heim S, Kiess M, et al . Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*. 1999;285(5432):1393-1396.

(52) Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J*. 2000;346 (1):1-8.

(53) Bianco A. C, Larsen P. R . Selenium, deiodinases and endocrine function. In: Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN, eds. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. 2nd ed. New York: *Springer*; 2006:207-219 .

(54) Burk R. F, Olson G. E, Hill K. E . Deletion of selenoprotein P gene in the mouse. In: Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN, eds. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. 2nd ed. New York: *Springer*; 2006:111-122.

(55) Kioussi C, Whanger P. D. Selenoprotein W in development and oxidative stress. In: Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN, eds. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. 2nd ed. New York: *Springer*; 2006:135-140.

(56) McKenzie R. C, Beckett G. J, Arthur J. R . Effects of selenium on immunity and aging. In: Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN, eds. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. 2nd ed. New York: *Springer*; 2006:311-323.

(57) Kiremidjian S. L, Roy M, Wishe H. I, Cohen M. W, Stotzky G . Supplementation with selenium and human immune cell functions. II. Effect on cytotoxic lymphocytes and natural killer cells. *Biol Trace Elem Res*,1994;41(1-2):115-127.

(58) Kiremidjian S. L, Roy M, Glickman R , et al . Selenium and immunocompetence in patients with head and neck cancer. *Biol Trace Elem Res*. 2000;73(2):97-111.

(59) Baum M. K, Miguez M. J, Campa A, Shor P. G . Selenium and interleukins in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*.2000;182:S69: 73.

(60) Beck M. A . Selenium and viral infections. In: Hatfield D .L, Berry M. J, Gladyshev V. N. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. 2nd ed. New York: *Springer*; 2006:287-298.

(61) Combs G. F, Gray W. P. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther*. 1998;79(3):179-192.

(62) Whanger P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br J Nutr*. 2004;91(1):11-28

(63) Garland M, Morris J. S, Stampfer M. J, et al . Prospective study of toenail selenium levels and cancer among women. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(7):497-505.

(64) Yu M. W, Horng I. S, Hsu K. H, Chiang Y. C, Liaw Y. F, Chen C. J . Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. *Am J Epidemiol*.1999;150(4):367-374.

(65) Zhuo H, Smith A. H, Steinmaus C. Selenium and lung cancer: a quantitative analysis of heterogeneity in the current

epidemiological literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(5):771-778.

(66) Brinkman M, Reulen R. C, Kellen E, Buntinx F, Zeegers M. P. Are men with low selenium levels at increased risk of prostate cancer?. *Eur J Cancer*. 2006;42(15):2463-2471.

(67) Salonen J. T, Alfthan G, Huttunen J. K, Pikkarainen J, Puska P. Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. *Lancet*. 1982;2(8291):175-179.

(68) Virtamo J, Valkeila E, Alfthan G, Punsar S, Huttunen J. K, Karvonen M. J. Serum selenium and the risk of coronary heart disease and stroke. *Am J Epidemiol*. 1985;122(2):276-282.

(69) Kardinaal A. F, Kok F. J, Kohlmeier L, et al . Association between toenail selenium and risk of acute myocardial infarction in European men. The EURAMIC Study. European Antioxidant Myocardial Infarction and Breast Cancer. *Am J Epidemiol*. 1997;145(4):373-379

(70) Rajpathak S, Rimm E, Morris J.S, Hu F. Toenail selenium and cardiovascular disease in men with diabetes. *J Am Coll Nutr*. 2005;24(4):250-256.

(71) Lippman S. M, Klein E. A, Goodman P. J, et al . Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*. 2009;301(1):39-51

(72) Kose K, Dogan P, Kardas Y, Saraymen R . Plasma selenium levels in rheumatoid arthritis. *Biol Trace Elem Res* ,1996;53:51-6.

(73) Aaseth J, Haugen M, Forre O. Rheumatoid arthritis and metal compounds- perspectives on the role of oxygen radical detoxification . *Analyst,* 1998;123:3- 6

(74) Baum M. K, Campa A . Role of selenium in HIV/AIDS. In: Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN, eds. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. 2nd ed. New York: *Springer*, 2006; 299-310.

(75) Burbano X, Miguez-Burbano M. J, McCollister K, et al . Impact of a selenium chemoprevention clinical trial on hospital admissions of HIV-infected participants. *HIV Clin Trials*. 2002;3(6):483-491

(76) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Selenium. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington D.C.: National Academy Press; 2000:284-324.

(77) Dietary Reference Intakes : RDAs and tolerable Upper intake Levels from recent NAS DRI Study : Sep 2000.

(78) Ellis DR and Salt DE. Plants, selenium and human health. Curr Opin Plant Biol 2003;6:273-9.

(79) Groff J. L, Gropper S. S and Hunt S. M . Microminerals. In: Advanced Nutrition and Human Metabolism. Minneapolis: *West Publishing Company, Minneapolis,* 1995, p. 381-384

(80) Ravaglia et al . Effect of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subjects aged > = 90 y. *American Journal of Clinical Nutrition,*2000; 71 (2): 590–598 .

(81) Jim M, Truswell, A. S. Essentials of Human Nutrition (2nd ed.). Oxford University , 2002.

(82) Ishida T, Himeno K, Torigoe Y, et al . Selenium deficiency in a patient with Crohn's disease receiving long-term total parenteral nutrition. *Intern Med*, 2003;42(2):154-7.

(83) Yusuf S. W, Rehman Q, Casscells W . Cardiomyopathy in association with selenium deficiency: a case report. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2002;26(1):63-6.

(84) Rannem T, Ladefoged K, Hylander E, Hegnhoj J, Staun M . Selenium depletion in patients with gastrointestinal diseases: Are there any predictive factors.1998;33:1057-61**.**

(85) de Jong N, Gibson R. S, Thomson C. D, et al . Selenium and zinc status are suboptimal in a sample of older New Zealand women in a community-based study. *J Nutr*. 2001;131(10):2677-84.

(86) MedSafe Editorial Team. "Selenium". *Prescriber Update Articles*. New Zealand Medicines and Medical Devices Safety Authority.2009-07-13

(87) Bates C. J, Thane C. W, Prentice A, et al . Selenium status and its correlates in a British national diet and nutrition survey: people aged 65 years and over. *J Trace Elem Med Biol.* 2002;16(1):1-8.

(88) Kadrabova J, Madaric A, Kovacikova Z, et al . Selenium status, plasma zinc, copper, and magnesium in vegetarians. *Biol Trace Elem Res*. 1995;50(1):13-24.

(89) M.Ferencik L. E. Modulatory effects of selenium and zinc on the immune system Folia Microbiol . 2003;48(3), 417-426

(90) Fang W, Wu P, Hu R, et al . Environmental Se-Mo-B deficiency and its possible effects on crops and Keshan-Beck disease (KBD) in the Chousang area, Yao County, Shaanxi Province, China. Environ Geochem Health. 2003;25(2):267-80.

(91) Shao S, Zheng B . The biogeochemistry of selenium in Sunan grassland, Gansu, Northwest China, casts doubt on the belief that Marco Polo reported selenosis for the first time in history . 2008;30(4):307-14.

(92) "Polo pony selenium levels up to 20 times higher than normal". 2009-05-05.

(93) Hellsten Y, Apple F. S and Sjodin B. Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* ,1996; 81(4):1484-1487.

(94) El-Bayoumy K . The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat Res*. 2001;475:123–39.

(95) Tinggi U . Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia" : a review. *Toxicol Rev* , 2003;137, 103–110.

(96) Goldhaber S. B . Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2003;38:232-42 .

(97) MacFarquhar J. K , et al . Acute Selenium Toxicity Associated with a Dietary Supplement . *Arch Intern Med* , 2010;170:256-261.

(98) Ashar B. H . The dietary supplement health and education act: time for a reassessment: comment on "acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Arch Intern Med* ,2010;170(3):261-3.

(99) Koller L. D , Exon J. H .The two faces of selenium-deficiency and toxicity are similar in animals and man . *Can J Vet Res*,1986;50:297-306 .

(100) Renwick A. G. Toxicology of micronutrients: Adverse effects and uncertainty . *J. Nutr*, 2006; 136: 493S–501S.

(101) Sword J. T, Pope A. L, Hoekstra W. G. Endotoxin and lipid peroxidation in vitro in selenium- and vitamin E-deficient and -adequate rat tissues. *J Nutr*. 1991;121(2):258-264.

(102) Schomburg L, Kohrle J. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Mol Nutr Food Res* , 2008;52:1235–46.

(103) Laura J, Raymond PhD, Nicholas V. C , Ralston PhD . Mercury: selenium interactions and health implications. *SMDJ, Special Issue*, 2004;7: (1).

(104) Zwolak I, Zaporowska H . Selenium interactions and toxicity: a review : Selenium interactions and toxicity. *Cell Biol Toxicol :* 2011.

(105) Azrak R. G, Cao S, Pendyala L, et al . Efficacy of increasing the therapeutic index of irinotecan, plasma and tissue

selenium concentrations is methylselenocysteine dose dependent. *Biochem Pharmacol* , 2007;73(9):1280-1287.

(106) Flodin N. W. Micronutrient supplements: toxicity and drug interactions. *Prog Food Nutr Sci*. 1990;14(4):277-331.

(107) Brown B. G, Zhao X. Q, Chait A, et al . Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med.* 2001;345(22):1583-1592.

(108) Niedzielski P, Siepak M . Analytical Methods for Determining Arsenic, Antimony and Selenium in Environmental Samples. *Polish Journal of Environmental Studies*,2003;12 (6): 653-667.

(109) The United States Pharmacopeia. USP-24/NF-19.United Stetes Pharmacopeial Convention, Inc.: Washington,D.C., 2357-2358.

(110) Revanasiddappa H. D. and Kumar T. N . A facil spectrophotometric method for determination of selenium. . *Anal.Sci*, 2001 ;17 (11) : 1309-1312 .

(111) Arslan Z. and Erstas N. Determination of trace elements in marine plankton by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Fresenius J.Anal. Chem*. 336 (3):273-228, 2001 .

(112) Forrer R. and Wenker C. H. Concentration of 17 trace elements in serum and whole blood of plains viscachas (Lagostomus maximus) by ICP-MS, their reference ranges, and their relation to cataract. *Biol. Trace Elem. Res,* 2001; 81 (1):47-62 .

(113) Kannamkumarath S. S, Wrobel K. and Vonderheide A. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different type of nut. *Anal. Bioanal. Chem* ,2002; 373(6): 454-460 .

(114) Bratter P. and Blasco I. N. Speciation as an analytical aid in trace element research in infant nutrition . *Analyst*, 1998;123 (5):821-826 .

(115) Yoshida M., Kimura Y. and Abe M. Quantitative evaluation of selenium contained in tea by high performance liquid chromatography . *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 2001;47 (3): 248-252.

(116) Revanasiddappa H. D, Banadahalli P . A new reagent system for the highly sensitive spectrophotometric determination of selenium . *Central European Journal of Chemistry*. 2006; 4(4): 592-603

(117) Izgi B, Gucer S and Jacimovic R . Determination of selenium in garlic (Allium sativum) and onion (Allium cepa) by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chem* , 2006;99:630-637 .

(118) Narayana B, Mathew M, et al . Spectrophotometric Determination of Selenium Using Potassium Iodide and Starch as Reagents , *Microchim. Acta*, 2003; 141(3-4): 175-178 .

(119) Douglas A, Skoog F, Holler J, Crouch S. R . Principles of Instrumental Analysis .6 th Edition , 2006 .

(120) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC.17th Edition.996,16 , 2000 .

(121) Al Zehouri J. Pharmaceutical instrumental analysis.Zahran publishing house. Amman, Jordan, 1997.

(122) Welz B and Sperling M . Atomic Absorption Spectrometry. 3rd Edition ,1999.

(123) Lauri H. J and Perämäki L. P. Spectrochemical Analysis By Atomic Absorption And Emission . 2nd Edition,2004.

(124) Soylak M, Tuzen M, Narin I and Sari H . Comparison of microwave, dry and wet digestion procedures for the determination of trace metal contents of spice samples produced in Turkey. *J. Food Drug Anal*, 2004;12: 254-258 .

(125) Altundag H and Tuzen M . Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES . *Food and chemical toxicology* , 2011;49(11):2800 -7

(126) Meier P. C and Zund R. E . Statistical Methods in Analytical Chemistry , USA ,Canada, John Wiley & Sons, Inc,2000.

(127) James E, Muth D . Basic statistics and pharmacuitical statical application, . chapter 9, analysis of variances,Marcel Deckker, New York, 1999, 224.

(128) Narin I, Tuzen M. and Soylak M . Comparison of sample preparation procedures for the determination of trace metals in house dust, tobacco and tea samples by atomic absorption spectrometry. *Annali di Chimica* ,2001; 126: (5) 715-719.

(129) Twyman R. M . Sample dissolution for elemental analysis: Wet digestion. In: Worsfold P, Townshend A, Poole

C (eds) .Encyclopedia of Analytical Science , 2^{nd} edition , 2005; 8:146-153.

(130) Bryce D. W, Izquierdo A, Luque de Castro M. D. Use of focused microwaves for expeditive shortening of sample pre-treatment: digestion and reduction procedures prior to selenium speciation as selenium (IV) or selenium (VI). *Analyst*, 1995;120:2171.4.

(131) Matek M, Blanu M . Destraction of food samples for selenium analysis . *Arh hig rada toksikol* ,1998; 49 (4): 301-305.

(132) Sabé R, Rubio R. and García-Beltrán L. Selenium determination in urine with atomic fluorescence detection . *Analytica Chimica Acta*, 2001;436(2): 215–221 .

(133) Rahman L, Corns W. T, Bryce D. W, Stockwell P. B . Determination of mercury, selenium, bismuth, arsenic and antimony in human hair by microwave digestion atomic fluorescence spectrometry. *TALANTA* , 2000; 52(5):833-843.

(134) ICH topic Q2 (R1), Valdation of Analytical procedures: Text and Methodology, London, European Medicines Agency, 2005.

(135) Ermer J, Mcb Miller J. H . Method validation in pharmaceutical analysis. *Ajohn Wiley Interscience* , 2005; 586-587-588-590-603-604-606-607-615-632.

(136) James E, Muth D, Basic statistics and pharmaceutical statical Application, chapter 9, analysis of variances, Marcel Deckker, NewYork, 1999, 224.